



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

Direttore: Ch.mo Prof. Paolo Simioni

U.O.C DI ANATOMIA PATOLOGICA

Direttore: Ch.mo Prof. Angelo Paolo Dei Tos

TESI DI LAUREA

DISORDINI LINFOPROLIFERATIVI B IN LINFOMA T ANGIOIMMUNOBLASTICO: CARATTERIZZAZIONE CLINICO-PATOLOGICA E MOLECOLARE

RELATORE: Prof. Angelo Paolo Dei Tos

CORRELATORE: Prof. Marco Pizzi

LAUREANDO: Tommaso Simionato

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 Classificazione e caratteristiche generali dei linfomi	5
1.2 Linfomi a cellule T periferiche	5
1.3 Linfoma T angioimmunoblastico (AITL).....	6
1.3.1 Epidemiologia dell’AITL	6
1.3.2 Presentazione clinica dell’AITL	7
1.3.3 Caratteristiche morfologiche dell’AITL	8
1.3.3.1 Coinvolgimento linfonodale in AITL.....	8
1.3.3.2 Coinvolgimento extra-nodale in AITL	9
1.3.4 Caratteristiche immunofenotipiche e biologiche dell’AITL	10
1.3.4.1 Le cellule neoplastiche T dell’AITL	10
1.3.4.2 Le cellule B nell’AITL	11
1.3.5 Caratteristiche genetiche dell’AITL	12
1.3.5.1 Biologia e mutazioni del gene <i>RHOA</i> nell’AITL	12
1.3.5.2 Biologia e mutazioni di regolatori epigenetici nell’AITL	13
1.3.5.3 Mutazioni dei geni del TCR.....	15
1.3.6 Biologia integrata e profili evolutivi dell’AITL.....	16
1.3.6.1 Relazioni biologiche tra AITL e CHIP	16
1.3.6.2 Profili evolutivi di AITL	17
1.3.7 Fattori prognostici dell’AITL	18
1.3.8 Terapia dell’AITL	19
2. OBIETTIVI DELLO STUDIO.....	22
3. MATERIALI E METODI	23
3.1 Popolazione dello studio.....	23
3.2 Raccolta e valutazione dei dati clinici.....	23
3.3 Valutazione istologica.....	24
3.4 Caratterizzazione immunoistochimica	25
3.5 Analisi molecolari.....	26
3.6 Valutazione statistica e approvazione del Comitato Etico competente	26
4. RISULTATI	27
4.1 Caratteristiche cliniche della popolazione dello studio.....	27
4.2 Caratteristiche istologiche dei campioni di linfomi a cellule TFH.....	29
4.3 Caratteristiche delle proliferazioni B/plasmacellulari associate a AITL ..	31

4.3.1	Caratteristiche istologiche dei DLBCL in AITL	32
4.3.2	Caratteristiche istologiche dei disordini polimorfi a cellule B in AITL	35
4.3.3	Caratteristiche istologiche delle proliferazioni plasmacellulari.....	35
4.3.4	Caratteristiche istologiche delle proliferazioni clonali di blasti B	37
4.4	Profilo molecolare degli AITL e delle proliferazioni B/plasmacellulari	39
5.	DISCUSSIONE	41
6.	CONCLUSIONI.....	45
7.	BIBLIOGRAFIA.....	46

RIASSUNTO

Presupposti dello studio. Il linfoma T angioimmunoblastico (AITL) è una rara neoplasia ematologica, appartenente alla categoria dei linfomi a cellule T *helper* follicolari (TFH). L’AITL può raramente associarsi a proliferazioni linfoidi B o plasmacellulari, positive o meno per EBV. Le caratteristiche istologiche e molecolari dei disordini linfoproliferativi B (B-LPD) insorti in AITL sono ancora poco note. Una loro miglior definizione potrebbe, tuttavia, supportarne la diagnosi e la gestione clinica.

Obiettivi dello studio. Obiettivi del presente studio sono: (i) descrivere le caratteristiche clinico-patologiche dei B-LPD insorti in AITL; (ii) valutare il profilo mutazionale di tali B-LPD, con speciale riferimento a geni frequentemente mutati in AITL; (iii) identificare *pattern* ricorrenti di malattia sulla base della presentazione clinica, delle caratteristiche istologiche e dello stato di EBV.

Materiali e metodi. Questo studio retrospettivo multicentrico ha considerato 32 pazienti affetti da linfomi a cellule TFH (29/32 AITL e 3/32 PTCL con fenotipo TFH), nei quali sia stato documentato un B-LPD sincro o metacrono al linfoma T. I preparati istologici dei campioni di B-LPD sono stati rivalutati da 2 ematopatologi, che hanno classificato ciascun caso sulla base di: (i) *pattern* di crescita; (ii) entità dell’infiltrato linfoide; (iii) composizione citologica dell’infiltrato (blasti di grande taglia, linfociti maturi di piccola taglia, linfociti plasmocitoidi e/o plasmacellule); (iv) fenotipo e indice proliferativo della popolazione B/plasmacellulare. Il profilo genetico dei B-LPD è stato valutato tramite analisi di *Next Generation Sequencing* (tecnologia Illumina), considerando mutazioni di *TET2*, *DNMT3A*, *IDH2* e *RHOA*^{G17V}. In 8 casi è stato possibile confrontare il profilo mutazionale dei B-LPD e dei corrispettivi AITL.

Risultati La popolazione dello studio comprendeva 19 pazienti di sesso maschile e 13 di sesso femminile con età mediana alla diagnosi di 73.0 anni (range 53.0-89.5 anni). La maggior parte dei casi presentava sintomi sistemici (8/9 [88.9%]) e stadio avanzato di malattia (14/15 [93.3%]). Il tasso di mortalità correlato a AITL è risultato del 60.0%.

La valutazione istologica dei B-LPD ha documentato 4 *pattern* di malattia: (i) linfomi B diffusi a grandi cellule (DLBCL, EBV-positivi o EBV-negativi); (ii) B-LPD polimorfi, EBV-positivi; (iii) espansioni clonali di blasti B (EBV-positivi o EBV-negativi); e (iv) discrasie plasmacellulari con caratteristiche di plasmocitoma extra-osseo. Tali patologie presentavano specifiche relazioni temporali e/o topografiche con i cloni TFH, verosimilmente correlate ai meccanismi patogenetici di ciascuna forma di B-LPD. Le analisi molecolari hanno identificato frequenti mutazioni di *TET2* (7/12 [58.3%]) e più rare mutazioni di *DNMT3A* (1/12 [8.3%]) e *IDH2* (2/12 [16.7%]). In 2 casi di B-LPD è stata inoltre documentata la mutazione *RHOA*^{G17V} a basso *burden* allelico (evidenza di cloni TFH istologicamente non documentabili). Le analisi mutazionali di campioni appaiati di AITL e B-LPD hanno identificato medesimi profili mutazionali di *TET2*, *DNMT3A* e *IDH2* con *burden* allelici quasi sovrapponibili.

Conclusioni. I B-LPD associati a linfomi TFH sono patologie eterogenee, riconducibili a 4 categorie istologiche principali. La caratterizzazione molecolare di tali B-LPD identifica frequenti mutazioni di *TET2* e (meno comunemente) *DNMT3A* e *IDH2*, che potrebbero essere presenti tanto in linfociti neoplastici quanto in cellule infiammatorie di accompagnamento. Ulteriori studi su più ampie coorti di pazienti contribuiranno a confermare tali risultati e a chiarire le basi biologiche dei B-LPD associati a linfomi TFH.

ABSTRACT

Background. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) is a rare hematological malignancy, belonging to the spectrum of T follicular helper (TFH) lymphomas. AITL is occasionally associated with B or plasma cell proliferations, which are variably positive for EBV. The histological and molecular characteristics of B-cell lymphoproliferative disorders (B-LPDs) in AITL are poorly understood. A better definition of their features may, nevertheless, support their diagnosis and clinical management.

Study aims. This study aims: (i) to describe the clinic-pathological characteristics of B-LPDs arising in AITL; (ii) to evaluate the mutational profile of these disorders, with focus on AITL-associated gene mutations; (iii) to identify recurrent disease patterns, based on clinical presentation, histological features, and EBV status.

Materials and methods. This retrospective multicenter study considered 32 patients with diagnosis of TFH cell lymphoma (29/32 AITL and 3/32 peripheral T-cell lymphomas with a TFH phenotype), in which synchronous or metachronous B-LPDs were documented. Histological samples of B-LPD were re-evaluated by two hematopathologists, who classified each case based on: (i) the growth pattern; (ii) the extent of lymph node infiltration; (iii) the cytology of the neoplastic infiltrate (large-sized blasts, small mature lymphocytes, plasmacytoid lymphocytes and/or plasma cells); (iv) the phenotype and proliferative index of the B and/or plasma cell population. The genetic profile of B-LPDs was assessed by Next Generation Sequencing (Illumina technology), considering mutations in *TET2*, *DNMT3A*, *IDH2*, and *RHOA*^{G17V}. In 8 cases, paired AITL and B-LPD samples were available to compare their mutational profiles.

Results. The study population included 19 males and 13 females with median age at diagnosis of 73.0 years (range 53.0-89.5 years). Most cases presented with systemic symptoms (8/9 [88.9%]) and advanced-stage disease (14/15 [93.3%]). AITL-related mortality was as high as 60.0%.

Histological evaluation of the B-LPDs disclosed 4 distinct disease patterns, including: (i) diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL, EBV-positive or EBV-

negative); (ii) EBV-positive polymorphic B-LPD; (iii) clonal expansions of B-blasts (EBV-positive or EBV-negative); and (iv) plasma cell dyscrasias with features of extra-osseous plasmacytoma. The temporal and anatomic relationship between B-LPDs and TFH lymphomas suggested a variety of pathogenic mechanisms for the former. Molecular analyses identified frequent mutations in *TET2* (7/12 [58.3%]), with rare derangements in *DNMT3A* (1/12 [8.3%]) and *IDH2* (2/12 [16.7%]). In 2 cases, the *RHOA*^{G17V} was documented at low allelic burden in the B-LPD samples, suggesting the occurrence of histologically undetectable TFH clones. Mutational analyses of paired AITL and B-LPD samples identified the same *TET2*, *DNMT3A*, and/or *IDH2* mutations with nearly overlapping allelic burdens.

Conclusions. TFH lymphoma-associated B-LPDs are a heterogeneous group of lymphoproliferative/plasma cell disorders, featuring 4 main histological patterns. The molecular characterization of these B-LPDs identifies frequent mutations in *TET2* and rarer mutations in *DNMT3A* and *IDH2*. These may theoretically occur in neoplastic lymphocytes, in accompanying inflammatory cells or in both. Further studies on larger cohorts of patients will help confirm these findings, also clarifying the biology of TFH lymphoma-associated B-LPDs.

1. INTRODUZIONE

1.1 Classificazione e caratteristiche generali dei linfomi

Le neoplasie linfoidi costituiscono un vasto spettro di patologie tumorali ematologiche, contraddistinte da un'espansione anomala di cloni linfocitari a partire da cellule B, cellule T o cellule *natural killer* (NK). In accordo con i criteri clinici, istologici e molecolari, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) classifica tali neoplasie in due gruppi principali: i linfomi di Hodgkin (HL) e i linfomi non-Hodgkin (nHL). All'interno di queste due categorie, sia gli HL che i nHL sono ulteriormente suddivisi in diverse entità nosologiche specifiche, ognuna caratterizzata da propri tratti distintivi a livello clinico, istologico e molecolare (1).

Per quanto concerne gli HL, si distinguono una variante classica, rappresentata dal linfoma di Hodgkin classico (cHL), e una forma nodulare a prevalenza linfocitaria (NLPHL). I nHL sono invece classificati in base al grado di maturazione delle cellule coinvolte (ossia se derivate da precursori o da cellule mature) e alla loro linea differenziativa (B o T/NK). All'interno dei nHL, si identificano quindi: linfomi/leucemie linfoblastiche di precursori B, linfomi/leucemie linfoblastiche di precursori T, nHL a cellule B periferiche e nHL a cellule T/NK periferiche. Le cellule NK, condividendo alcune somiglianze immunofenotipiche e funzionali con le cellule T, sono raggruppate con quest'ultime a fini classificativi.

1.2 Linfomi a cellule T periferiche

I linfomi a cellule T periferiche (PTCL), comunemente denominati linfomi a cellule T mature e NK, rappresentano una categoria eterogenea di malattie con manifestazioni cliniche variabili. In particolare, possono presentare un coinvolgimento predominante a livello nodale (i.e. nPTCL), oppure extranodale, oltre a rare forme leucemiche. I nPTCL possono essere suddivisi per fenotipo e presunta cellula di origine, distinguendo quelli di origine T helper follicolare (TFH; categoria denominata 'linfomi T periferici con fenotipo TFH'), da quelli di origine non-TFH (PTCL, non altrimenti specificati [PTCL, NOS]; linfomi anaplastici a grandi cellule, ALK-positivi e ALK-negativi; etc.) (2).

I linfomi a cellule T periferiche con fenotipo TFH sono una categoria nosologica introdotta nella classificazione WHO del 2016, che include: (i) il linfoma T angioimmunoblastico (AITL); (ii) i nPTCL con fenotipo TFH e (iii) il linfoma T follicolare (FTCL).

Le cellule TFH costituiscono una sottopopolazione specializzata di cellule T helper che risiede nei follicoli dei centri germinativi per dare supporto alla sopravvivenza, proliferazione, maturazione e migrazione delle cellule B. Il fenotipo TFH è determinato dall'espressione di almeno due (possibilmente tre) marker di linea TFH, tra i quali *programmed death-1* (PD1), *inducible T-cell costimulator* (ICOS), CD10, *B-cell lymphoma 6 protein* (BCL6), *C-X-C motif chemokine receptor 5* (CXCR5) e *C-X-C motif chemokine ligand 13* (CXCL13) (3).

1.3 Linfoma T angioimmunoblastico (AITL)

Negli anni '70, vari studi descrissero per la prima volta quadri clinici e istologici di AITL, inizialmente considerati condizioni iperimmuni non neoplastiche. A tale patologia vennero attribuiti vari nomi, quali “malattia immunodisplastica”, “infoadenopatia angioimmunoblastica con disproteinemia” (AILD) o “linfadenopatia immunoblastica” (IBL) (4). Nel corso degli anni '90, parallelamente alla comprensione della fisiologia delle cellule TFH, fu scoperta la natura neoplastica della patologia, a cui seguì l'introduzione del termine ‘linfoma T angioimmunoblastico’. L’AITL esemplifica infatti una neoplasia caratterizzata da un'intensa risposta infiammatoria e iperimmune, come evidenziato dalle sue proprietà biologiche, cellulari, cliniche e patologiche (4).

1.3.1 Epidemiologia dell’AITL

I PTCL rendono conto di una minoranza dei casi di nHL, rappresentandone solo il 10-15% (5). Di questi, il PTCL-NOS è il più comune sottotipo a livello globale, ad eccezione dell'Asia, dove il linfoma extra-nodale a cellule T-NK è più frequente (6).

L’AITL rende conto del 18% dei PTCLs ed è il secondo sottotipo più comune a livello mondiale. Esso costituisce il 21% di tutti i PTCLs in Europa e Nord America, mentre è significativamente meno comune in Sud America (7% dei PTCLs) (7). In Asia, l’AITL rappresenta il 18-25% dei PTCLs, attestandosi come il secondo o terzo sottotipo più diffuso nella regione (8). L’AITL presenta una età

media alla diagnosi di 64 anni senza netta prevalenza di genere. Il 90% dei casi viene diagnosticato in stadio avanzato (9).

1.3.2 Presentazione clinica dell'AITL

L'AITL presenta una moltitudine di manifestazioni cliniche peculiari. Anche per questo, la maggior parte delle diagnosi viene formulata dopo settimane o mesi di sintomi non localizzanti, riscontri fisici transitori e un'ampia gamma di anomalie sierologiche o radiografiche (10).

Le manifestazioni sintomatologiche e i reperti obiettivi più comuni in AITL includono i sintomi B (febbre, perdita di peso involontaria e/o sudorazione notturna) e la presenza di linfadenopatia. Quest'ultima, quando presente, viene evidenziata alla tomografia computerizzata (CT) come una malattia nodale di dimensioni ridotte, compresa tra 1,5 e 3 cm. Anche l'epatosplenomegalia è osservabile in una percentuale modesta di pazienti.

Alla diagnosi lo stadio precoce di AITL è molto raro, rendendo conto solamente del 10% dei casi (11). Quasi il 70% dei pazienti presenta coinvolgimento midollare e, a volte, questo può costituire il primo reperto istologico. Le manifestazioni cutanee sono riscontrate nel 20-50% dei casi, variando da alterazioni orticarioidi a lesioni nodulari. Molte eruzioni cutanee compaiono in seguito all'esposizione ad antimicrobici (12). Il coinvolgimento di altri siti extranodali, oltre a midollo osseo e cute, è meno frequente.

L'AITL può manifestarsi con segni di attivazione del sistema immunitario, quali elevata VES e positività a test sierologici per malattie autoimmuni (e.g. fattore reumatoide, anticorpi anti-muscolo liscio, complessi immuni circolanti o agglutinine fredde). All'elettroforesi delle proteine sieriche si ha frequentemente gammopatia policlonale. Meno comune è, invece, la gammopatia monoclonale, che è stata riportata nel 10% dei casi. Sono possibili anche quadri di anemia emolitica autoimmune da anticorpi caldi (DAT) e di eosinofilia, con o senza eziologia infettiva. La presenza di linfociti atipici alla valutazione morfologica dello striscio periferico è rara, mentre popolazioni linfoidi atipiche possono essere documentate mediante citometria a flusso del sangue periferico (13).

1.3.3 Caratteristiche morfologiche dell'AITL

L'AITL presenta un ricco microambiente infiammatorio all'interno del quale, oltre alle cellule T neoplastiche, si localizzano anche cellule T e B reattive, plasmacellule, istiociti ed eosinofili. Sono tipicamente presenti anche numerose venule ad alto endotelio (HEVs), segno di neoangiogenesi, e reti di cellule dendritiche follicolari (FDCs) espanse e distorte. Le caratteristiche morfologiche dell'AITL variano a seconda dei tessuti interessati dalla malattia.

1.3.3.1 Coinvolgimento linfonodale in AITL

I linfonodi coinvolti dall'AITL presentano un sovvertimento architetturale parziale o completo, con estensione al tessuto adiposo peri-linfonodale. I seni corticali periferici sono spesso risparmiati e pervi (14). L'infiltrato infiammatorio presenta pattern di crescita diffuso o vagamente nodulare ed è composto da una popolazione polimorfa di linfociti, immunoblasti, istiociti, plasmacellule ed eosinofili (14,15). I follicoli B hanno alterazioni regressive o sono del tutto assenti, nonostante sia frequente una proliferazione di FDCs nelle regioni extra-follicolari, spesso attorno a HEVs (16).

Le cellule T neoplastiche sono usualmente di piccola o media taglia, con citoplasma chiaro, aggregate attorno alle HEVs e avvolte dalle maglie di FDCs (17). Altre volte, la popolazione di cellule tumorali può essere oscurata da grandi immunoblasti B o da abbondanti plasmacellule. Si possono osservare anche cellule multinucleate simili-Hodgkin/Reed-Sternberg (cellule *HRS-like*) (18).

Tre differenti pattern istologici sono stati descritti in letteratura per l'AITL: pattern I, pattern II e pattern III (19). Il pattern I si presenta con architettura largamente conservata e follicoli iperplastici. I follicoli presentano solitamente margini non definiti, con zone mantellari attenuate o obliterate, circondate da un alone di cellule chiare atipiche. Il pattern II presenta architettura parzialmente sovvertita, con follicoli sparsi e con alterazioni regressive. Si osserva inoltre una marcata proliferazione extrafollicolare di FDCs. Il pattern III è caratterizzato da un completo sovvertimento dell'architettura nodale con follicoli assenti o atrofici. La proliferazione di FDCs è irregolare. Le cellule neoplastiche, nel pattern I, hanno predominante distribuzione perifollicolare, mentre nel pattern II e III tendono a formare aggregati più o meno ampi. La maggior parte dei casi di AITL dimostra pattern istologici II e III, mentre il pattern I è meno comune (e particolarmente

difficile da identificare) (14). La progressione da pattern I a pattern III è stata documentata in campioni biotici sequenziali e si ritiene rappresenti l'evoluzione morfologica della malattia (20).

1.3.3.2 Coinvolgimento extra-nodale in AITL

L'AITL si presenta tipicamente come patologia sistemica e, oltre al coinvolgimento linfonodale, si osserva spesso interessamento di cute, midollo osseo, milza e polmoni (11).

Il coinvolgimento cutaneo si ha in circa la metà dei pazienti, più comunemente sotto forma di eruzioni maculo-papulari non specifiche, morbilliformi o esantematose. Altre manifestazioni possono includere eruzioni cutanee orticarioidi o purpuriche, lesioni papulovesicolari, nodulari, placche squamo-eritematose e lesioni ulcerate. A causa della variabilità delle possibili manifestazioni dermatologiche, i pazienti con AITL sono spesso sottoposti a biopsia cutanea. La diagnosi istologica dell'AITL alla cute è particolarmente complessa, in quanto le caratteristiche istopatologiche di questa malattia sono sfuggenti e non sono completamente caratterizzate. L'esame istologico delle lesioni cutanee spesso dimostra un minimo infiltrato linfoide perivascolare e periannessiale, difficile da differenziare da condizioni infiammatorie. Le caratteristiche peculiari delle forme a presentazione nodale (e.g. cellule chiare, iperplasia delle HEV e positività per EBV in cellule B), sono osservate solo in una minoranza dei casi alla cute. La documentazione di marcatori immunoistochimici di linfociti TFH, per quanto utile, non è del tutto specifica di AITL e può essere riscontrata anche in condizioni infiammatorie e in altri linfomi cutanei a cellule T (21).

Il coinvolgimento del midollo osseo può essere riscontrato nel 60-80% degli AITL. In questi casi, sono frequenti sintomi sistemici e alterazioni clinico-laboratoristiche, quali epatosplenomegalia, febbre, versamento pleurico, anemia, ipoalbuminemia, elevati livelli sierici di LDH, ipocalcemia e iponatriemia (11). Le caratteristiche istomorfologiche dell'AITL nel midollo osseo differiscono notevolmente da quelle a livello nodale. Nella maggiore parte dei casi sono presenti aggregati linfoidi paratrabeolari o centro-lacunari polimorfi, costituiti da linfociti di piccola/media e (raramente) grande taglia, associati a istiociti, granulociti eosinofili e plasmacellule. Solo di rado si documentano aggregati di cellule con citoplasma chiaro e reti di FDCs. Possono essere presenti varie alterazioni midollari

secondarie all'infiltrato neoplastico, come iperplasia trilineare, plasmocitosi policlonale e fibrosi interstiziale. Studi immunoistochimici hanno dimostrato una ridotta espressione di marcatori TFH nel midollo osseo rispetto ai linfonodi. Per questo, quando la biopsia midollare è l'unico campione a disposizione, può risultare complicato (se non impossibile) porre diagnosi di AITL (22).

1.3.4 Caratteristiche immunofenotipiche e biologiche dell'AITL

L'eterogeneità delle popolazioni cellulari che compongono i tessuti di AITL giustifica la presenza di quadri immunoistochimici complessi e variabili da caso a caso. Nei paragrafi che seguono, saranno descritte le caratteristiche biologiche e immunofenotipiche delle principali cellule che partecipano al processo neoplastico.

1.3.4.1 Le cellule neoplastiche T dell'AITL

Come precedentemente accennato, le cellule da cui origina l'AITL sono i linfociti TFH. Ciò è stato dimostrato mediante studi molecolari, che hanno rilevato simili profili di espressione genica tra cellule TFH e cellule neoplastiche dell'AITL (23).

Nelle reazioni immunologiche, le cellule TFH svolgono un ruolo fondamentale per la differenziazione dei linfociti B e per il mantenimento della tolleranza periferica (24). L'interazione tra cellule T e B avviene nei tessuti linfoidei secondari, che costituiscono il microambiente ideale affinché i linfociti T e i linfociti B interagiscano tra loro e con altri tipi di cellule (e.g. cellule dendritiche e FDCs). I tessuti linfoidei secondari contengono una delle strutture essenziali per la risposta cellulare T-dipendente, ovvero i centri germinativi (CG). Le cellule B proliferanti nei CG (i.e. centroblasti) sono sottoposte ad un processo di ipermutazione somatica a livello dei geni della regione variabile delle immunoglobuline. I centroblasti escono quindi dal ciclo cellulare per diventare centrociti e, se riconoscono l'antigene espresso dalle FDCs, possono processarlo e presentarlo alle cellule TFH.

L'interazione tra centrociti e cellule TFH, può avere esiti differenti, in quanto può (i) favorire la sopravvivenza e la selezione di centrociti ad alta affinità, (ii) fornire segnali per la differenziazione verso cellule della memoria e plasmacellule a lunga emivita o (iii) perpetuare la reazione del centro germinativo, stimolando il riciclo dei centrociti a centroblasti. In assenza di cellule TFH antigene-specifiche, i centrociti sono eliminati e i CG sono biologicamente

inefficienti. Da quanto illustrato, risulta evidente che una disregolazione delle cellule TFH (come nel caso dell'AITL) può causare reazioni disimmuni di gravità variabile.

La valutazione immunohistochimica delle cellule tumorali svolge un ruolo chiave nella diagnosi di AITL. Nello specifico, le cellule neoplastiche esprimono i marcatori pan-T (CD2, CD3, CD5 e CD7) con possibili e variabili difettività. Esse sono solitamente CD4 positive, esprimono le catene α/β del T cell receptor (TCR) e risultano positive per CD30 in circa il 50% dei casi (positività spesso debole/parziale, più evidente in regioni perivascolari) (14). Marcatori chiave per identificare la natura TFH delle cellule neoplastiche sono PD1, CD10, BCL6, CXCL13, ICOS e CXCR5 (23). Per definizione, è richiesta l'espressione di almeno due di tali marcatori, in quanto essi non sono del tutto specifici per AITL e dimostrano espressione spesso eterogenea.

Ai fini diagnostici, è quindi essenziale considerare attentamente l'intensità e la distribuzione dei marcatori TFH, assicurandosi che il pattern di espressione sia in linea con i reperti morfologici (14). Poiché le cellule T reattive mostrano spesso espressione debole e variabile di PD1, solo un'intensa positività per tale marcatore ha rilevanza diagnostica. Inoltre, l'espressione di CD10 è solitamente osservata in una piccola frazione di cellule neoplastiche e può variare di intensità e distribuzione. Tra i marcatori TFH, PD1 e ICOS sono considerati i più sensibili, mentre CXCL13 e CD10 risultano i più specifici (25).

1.3.4.2 Le cellule B nell'AITL

L'AITL è spesso accompagnato da una proliferazione di cellule B, che variano da occasionali blasti di grande taglia, a cellule HRS-like o plasmacellule. Tali cellule possono essere infettate o meno dal virus di Epstein-Barr (EBV). Nel complesso, circa l'80% degli AITL presenta quote variabili di cellule B EBV-positivo (26).

La caratterizzazione immunohistochimica dei blasti B in corso di AITL dimostra positività per i marcatori pan-B (CD20, CD79a, PAX5, CD22, OCT2, BOB1) con frequente espressione di MUM1, BCL6 e BCL2. L'immunoreazione per CD10 è solitamente negativa e l'indice proliferativo di tali elementi (reazione per Ki67) è elevato. La valutazione delle catene leggere delle immunoglobuline può dimostrare sbilanciamento del rapporto kappa/lambda in casi con evidente

differenziazione plasmacellulare. In tal caso, l'immunoreazione per CD20 può essere negativa e può aversi variabile positività per CD138. L'infezione da EBV può essere documentata mediante reazioni di ibridazione in situ per EBV (EBER).

1.3.5 Caratteristiche genetiche dell'AITL

Recenti studi genetici negli AITL hanno identificato mutazioni ricorrenti del gene *RHOA* (50-70%) e in geni codificanti regolatori epigenetici, quali *TET2* (47-83%), *DNMT3A* (20-30%) e *IDH2* (20-45%). Sono inoltre presenti mutazioni in geni della via di segnale del TCR che includono *PLCG* (14%), *CD28* (9-11%), il proto-oncogene *FYN* (3-4%) e *VAV1* (5%) (3).

Quasi tutte le mutazioni di *RHOA* riscontrate in AITL sono del tipo p.G17V (*RHOA*^{G17V}). Mutazioni G17V di *RHOA* sono state comunemente osservate anche in altri linfomi a cellule TFH (57-62% dei nPTCL-TFH; 60% dei FTCL), mentre sono rare in disordini linfoproliferativi non-TFH (27). Al contrario, mutazioni di *TET2* e *DNMT3A* sono riscontrabili in una vasta gamma di neoplasie ematologiche (28) e in corso di ematopoiesi clonale di potenziale indeterminato (i.e. CHIP).

Tra i linfomi a cellule T, le mutazioni di *TET2* presentano prevalenza maggiore nei nPTCL con fenotipo TFH rispetto a casi non-TFH. Le mutazioni di *IDH2* possono essere riscontrate in neoplasie mieloidi, ma non in altri linfomi a cellule T. Le mutazioni coinvolgenti componenti della via del TCR e di *CD28* sono comunemente osservate nei nPTCL con fenotipo TFH, ma possono essere presenti anche in altri linfomi T (29). Tutte queste mutazioni possono essere presenti in varie combinazioni: gli AITL con mutazioni di *RHOA* presentano spesso mutazioni di *TET2* e una parte di questi sono mutati anche in *IDH2* (30). Tale co-occorrenza potrebbe contribuire in modo sinergico alla trasformazione neoplastica.

1.3.5.1 Biologia e mutazioni del gene *RHOA* nell'AITL

La mutazione di *RHOA*^{G17V} coinvolge fino al 70% degli AITL ed è considerata un evento biologico distintivo e rilevante per la diagnosi dei linfomi nPTCL con fenotipo TFH. *RHOA* è una piccola proteina della famiglia delle guanosina trifosfato (GTP)-binding proteins. Essa può trovarsi in uno stato inattivo, quando lega la guanosina-difosfato (GDP), o in uno stato attivo, quando lega la GTP. Fattori di scambio nucleotidici (GEFs) attivano *RHOA*, rimpiazzando la GDP con la GTP.

RHOA media processi biologici fondamentali tra cui il controllo dell'apoptosi, del ciclo cellulare, dell'adesione cellula-cellula e della citochinesi. Studi condotti su modelli animali hanno evidenziato un ruolo chiave per questa proteina nel mediare la migrazione e la polarizzazione delle cellule T, lo sviluppo dei timociti e l'attivazione del signalling pre-TCR (31).

La mutazione G17V colpisce un sito molto importante per l'attività della proteina. La Glicina 17 di *RHOA*, infatti, si trova in una tasca deputata al legame della GTP. La sostituzione della Glicina 17 con una Valina impedisce il legame della GTP, alterando verosimilmente l'attività biologica della proteina (30,32). L'effetto oncogenico di tale mutazione potrebbe tuttavia dipendere da meccanismi GTP-indipendenti: rari casi di AITL presentano, infatti, mutazioni alternative di *RHOA* (e.g. p.K18M) con effetto opposto sul legame della GTP. È quindi possibile che il ruolo oncogenetico della mutazione *RHOA*^{G17V} non sia dovuto all'interruzione del signaling della proteina, ma all'acquisizione di proprietà biologiche alternative.

In merito a ciò, è stato recentemente scoperto che la forma mutata di *RHOA* è in grado di legare e attivare direttamente la proteina *VAV1*, un mediatore cruciale nella via del TCR (33). *VAV1*, in particolare, agisce sia come GEF che come adattatore per il complesso di segnale del TCR. Aumentando il signaling del TCR, l'asse *RHOA*^{G17V} -*VAV1* potrebbe quindi contribuire allo sviluppo di linfomi T, allo stesso modo in cui un aumentato signaling del B-cell receptor favorisce lo sviluppo di molti linfomi B.

1.3.5.2 Biologia e mutazioni di regolatori epigenetici nell'AITL

I regolatori dello stato epigenetico svolgono un ruolo molto importante nella biologia dell'AITL e degli altri nPTCL con fenotipo TFH. *TET2* codifica per una metilcitosina-diossigenasi, che converte la citosina metilata (mC) in idrossimetilcitosina (hmC), formilcitosina (fC) e carbossicitosina (CaC). Queste citosine modificate funzionano sia come intermediari del processo di demetilazione passiva e attiva, sia come *marker* epigenetici (34).

Nell'AITL è possibile riscontrare mutazioni *nonsense* e *frameshift* lungo tutta la proteina *TET2*, mentre mutazioni missenso si trovano quasi sempre a livello del solo dominio catalitico C-terminale. Questa distribuzione suggerisce che le mutazioni di *TET2* siano di tipo *loss of function* (3). Le mutazioni di *TET2* colpiscono generalmente i linfociti T neoplastici, ma, in alcuni casi, possono essere

riscontrate anche a livello di cellule B e di elementi mieloidi (35). È verosimile, quindi, che tali mutazioni si verifichino in cellule staminali emopoietiche midollari e che vengano ereditate da tutte le cellule (linfoidi e mieloidi) che da esse derivano. Questo potrebbe contribuire allo sviluppo di linfomi B e di neoplasie mieloidi in pazienti con AITL.

DNMT3A codifica per una DNA metiltransferasi, coinvolta nella metilazione di gruppi CpG. Le mutazioni di *DNMT3A* in AITL si distribuiscono lungo tutta la proteina. La mutazione p.R882H costituisce circa il 15% delle mutazioni di *DNMT3A* in corso di AITL (30), mentre rende conto di più della metà delle mutazioni riscontrate in le neoplasie mieloidi (36). La proteina mutata presenta una ridotta attività metiltransferasica ed è in grado di inibire in modo dominante-negativo la proteina *wild-type* (37). Le mutazioni di *DMNT3A* possono co-esistere con mutazioni di *TET2*, analogamente a quanto osservato nelle neoplasie mieloidi. Ciò ha verosimilmente un effetto sinergico sullo sviluppo dell'AITL, come dimostrato in recenti modelli murini (38).

Mutazioni di *IDH2* sono presenti nel 20-45% degli AITL (3). *IDH2* codifica per un'isoforma di isocitrato deidrogenasi che, in condizioni fisiologiche, converte l'acido isocitrico in α -chetoglutarato (α -KG). L' α -KG rappresenta un metabolita intermedio nel ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA) e costituisce un substrato anche per enzimi di altre vie metaboliche. Le mutazioni di *IDH2* determinano un'alterazione delle proprietà catalitiche della proteina, portando alla produzione dell'oncometabolita D-2-idrossiglutarato (D-2-HG). Il D-2-HG inibisce l'attività enzimatica α -KG-dipendente delle diossigenasi, inclusa la famiglia delle proteine *TET*. Ciò, a sua volta, determina modificazioni dell'assetto epigenetico della cellula, promuovendone la trasformazione neoplastica.

Nell'AITL, le mutazioni di *IDH2* sono presenti esclusivamente in posizione p.R172 (30,39) e caratterizzano la sola componente T neoplastica. La presenza di tali mutazioni determina un incremento dei livelli sierici e tissutali di D-2-HG, che possono essere utilizzati come valido surrogato alle analisi molecolari per la ricerca della mutazione (40). Mutazioni di *IDH2* e *TET2* possono coesistere nell'AITL, il che suggerisce l'esistenza di bersagli diversi da *TET2* per l'oncometabolita D-2-HG (e.g. proteine *TET* diverse da *TET2*; istone-demetilasi Jumonji-C). Questa ipotesi è corroborata da studi epigenetici, che hanno dimostrato una maggiore metilazione

del DNA e dell'istone H3K27 in campioni di AITL con mutazioni di *TET2* e *IDH2*, rispetto a casi con sole mutazioni di *TET2* (41). Tale profilo mutazionale e i suoi effetti biologici costituiscono il razionale per lo sviluppo di terapie con agenti ipometilanti (e.g. azacitidina) nell'AITL (42).

Nonostante le mutazioni in regolatori epigenetici siano state ampiamente caratterizzate nell'AITL, poco ancora si sa sul loro impatto sui profili di espressione genica. Nell'AITL è stata frequentemente riscontrata ipermetilazione dell'introne 1 di *BCL6*, soprattutto in pazienti con mutazioni di *TET2* (43). Questo introne agisce come silenziatore dell'espressione di *BCL6* e la sua ipermetilazione promuove l'espressione della proteina. *BCL6*, a sua volta, agisce come repressore trascrizionale e svolge un ruolo molto importante nella biologia dei linfociti B del CG e di diversi sottotipi di cellule T, inclusi i linfociti TFH. L'aumentata espressione di *BCL6* secondaria alla perdita di funzione di *TET2*, potrebbe promuovere quindi la differenziazione delle cellule T CD4-positivo in senso TFH, favorendo la biologia dell'AITL.

Le mutazioni p.R172 di *IDH2* sono state associate a un'ipermetilazione globale del DNA e a livelli più elevati di H3K27me3 (41). Questa ipermetilazione causa a sua volta una riduzione dell'espressione di geni, che sono coinvolti nella differenziazione Th1 dei linfociti T. Poiché l'accumulo di D-2-HG, risultante dalla mutazione di *IDH2*, inibisce la funzionalità di *TET2*, la co-esistenza di mutazioni di *TET2* e *IDH2* favorisce ulteriormente la differenziazione in senso TFH dei linfociti neoplastici. In particolare, dato che le mutazioni di *TET2* precedono solitamente quelle di *IDH2*, è probabile che alterazioni *TET2*-mediate dell'espressione di *BCL6* promuovano la differenziazione verso cellule TFH-like e che l'acquisizione di mutazioni di *IDH2* rinforzi questo effetto (44).

1.3.5.3 Mutazioni dei geni del TCR

Circa metà dei pazienti con AITL presenta mutazioni attivanti la via del TCR (27). Il *signaling* del TCR richiede il legame con specifici antigeni, la co-stimolazione da parte di *CD28* e l'attivazione di Src-chinasi quali *FYN*, per la fosforilazione di target a valle (i.e. *PLCγ* e *VAV1*).

Mutazioni di *CD28* sono state identificate nel 10-20% degli AITL e interessano più spesso i codoni p.D124 e p.T195 (45,46). Queste mutazioni attivano costitutivamente il *signaling* del TCR, aumentando l'affinità per i ligandi o

l'interazione con proteine adattatrici. Un effetto simile è verosimilmente mediato da proteine di fusione, quali *CTLA4-CD28* e *ICOS-CD28*. Oltre ad alterazioni di *CD28*, sono state riportate anche mutazioni attivanti *FYN*, che causano perdita della porzione C-terminale o di domini regolatori SH2 della proteina (47). Analoghi effetti hanno mutazioni di *PLCG* e *VAV1* (33).

In tale contesto, è importante notare come le mutazioni della via del TCR e del gene di *RHOA* siano di solito mutualmente esclusive (46). Ciò suggerisce un ruolo patogenetico molto rilevante per il signaling di TCR, che determinerebbe la trasformazione neoplastica, anche in assenza di altre mutazioni fortemente associate allo sviluppo di AITL.

1.3.6 Biologia integrata e profili evolutivi dell'AITL

Da quanto fin qui discusso, emerge chiaramente la complessità biologica dell'AITL e dei linfomi di derivazione dai linfociti TFH. Ogni tentativo di comprensione della malattia non può quindi precludere dall'integrazione di multipli parametri genetici e biologici, che considerino non solo i cloni T neoplastici, ma anche le cellule che accompagnano la proliferazione T. Queste comprendono sia elementi di derivazione mieloide (granulociti, istiociti, cellule accessorie) che linfociti B (cfr paragrafo 1.3.3). Una visione integrata della biologia dell'AITL deve pertanto prendere in considerazione anche (i) la frequente associazione tra linfomi di derivazione TFH e CHIP e (ii) i profili evolutivi a ricca componente B di questi linfomi.

1.3.6.1 Relazioni biologiche tra AITL e CHIP

Diversi studi hanno dimostrato come le mutazioni di *TET2* e *DNMT3A* non siano limitate ai cloni T neoplastici, potendo interessare anche cellule B e mieloidi dei pazienti con AITL. Al contrario, le mutazioni di *RHOA* e *IDH2* sembrano essere limitate alle cellule T neoplastiche (48,49). Queste osservazioni hanno portato a ipotizzare un processo di cancerogenesi multilineare e in step multipli, secondo il quale una deregolazione epigenetica a livello di cellule staminali ematopoietiche midollari (i.e. alterazioni in *TET2* e/o *DNMT3A*) è seguita da mutazioni in geni importanti per la funzione delle cellule T e del TCR (i.e. *RHOA*, *CD28*, *FYN*, *PLCG* e *VAV1*), tali da indurre l'insorgenza di cloni AITL (50).

A supporto di questa interpretazione biologica, i pazienti con AITL presentano un'augmentata frequenza di CHIP e di neoplasie mieloidi (e.g. leucemia

mielomonocitica cronica; leucemia mieloide acuta) rispetto alla popolazione generale. In alcuni casi, le neoplasie mieloidi condividono con i cloni AITL mutazioni di *TET2* e/o *DNMT3A*, suggerendo un'evoluzione divergente a partire da una cellula staminale ematopoietica comune (51).

Queste osservazioni sono in linea con l'elevata prevalenza di mutazioni di *TET2* e *DNMT3A* in pazienti di età adulta-anziana, anche clinicamente asintomatici (i.e. emopoiesi clonale età-correlata). La presenza di mutazioni pre-maligne nei pazienti con AITL suggerisce in particolare che la CHIP possa precedere di molti anni l'insorgenza di AITL e che solo una minima quota di pazienti con CHIP vada incontro a una neoplasia linfoide a differenziazione TFH. Una precisa caratterizzazione della storia naturale della CHIP e della sua evoluzione a AITL richiede, tuttavia, ulteriori studi prospettici su ampie popolazioni di pazienti (3).

1.3.6.2 Profili evolutivi di AITL

Oltre all'associazione con cloni mieloidi, gli AITL si associano raramente a espansioni di blasti B o plasmacellule variabilmente infettate da EBV. Tali proliferazioni costituiscono un fenomeno unico nell'ambito dei PTCL e sottendono una varietà di quadri istologici e di possibili meccanismi biologici.

Tradizionalmente, le proliferazioni B associate ad AITL sono distinte in (i) linfomi B diffusi a grandi cellule (DLBCL) EBV-positivi o (più raramente) EBV-negativi, (ii) proliferazioni simil-linfoma di Hodgkin classico ed (iii) espansioni plasmacellulari EBV-negative con caratteristiche di plasmocitoma extra-osseo (52). Tali proliferazioni possono essere sincrone o metacrone all'AITL, potendo precedere o seguire la diagnosi di linfoma T anche di diversi mesi (53,54).

Per lungo tempo si è ipotizzato che l'espansione di cellule B EBV-positive nel contesto degli AITL fosse un epifenomeno dovuto a difetti di sorveglianza immunologica. Questo scenario spiegherebbe anche la presenza di cellule B HRS-like EBV-positive in altri processi linfoproliferativi T, quali la leucemia a cellule T dell'adulto (55). Tale ipotesi non è tuttavia sostenuta dalla presenza (non eccezionale) di espansioni B e plasmacellulari EBV-negative in casi di AITL.

Vari meccanismi sono stati ipotizzati per spiegare questo fenomeno. In primo luogo, l'emergenza di blasti B/plasmacellule atipiche potrebbe essere conseguenza di un'alterata maturazione secondaria a interazione con le cellule TFH neoplastiche. Questa ipotesi è sostenuta istologicamente dalla presenza di rosette

TFH attorno alle cellule B atipiche (56). Una seconda ipotesi, seppur meno probabile, suggerisce una transitoria infezione di EBV come causa dell'espansione dei cloni B (così detto meccanismo “*hit and run*” delle proliferazioni correlate a EBV) (57). Un'ultima alternativa è rappresentata dalla possibile relazione clonale tra linfociti TFH neoplastici e cloni B atipici.

Recenti studi hanno, infatti, dimostrato la presenza di simili mutazioni di *TET2* e *DNMT3A* nei blasti B e nei linfociti TFH degli AITL. Ciò sarebbe spiegato dalla presenza di cellule staminali ematopoietiche multipotenti mutate in geni regolatori dell'epigenetica, in grado di differenziarsi in elementi di linea B, T e mieloide (3,35). Le cellule B presenti nel microambiente dell'AITL potrebbero quindi essere state soggette a processi di selezione clonale, a partire da elementi pre-maligni mutati in *TET2* e *DMNT3A* nel midollo osseo.

Queste ipotesi patogenetiche non sono mutualmente esclusive e potrebbero essere alla base dell'eterogeneità delle espansioni B e plasmacellulari in pazienti con AITL. Al momento, tuttavia, non esistono studi che abbiano approfondito questo fenomeno da un punto di vista istologico e molecolare.

1.3.7 Fattori prognostici dell'AITL

La storia naturale dell'AITL è probabilmente la più variabile tra i PTCL. Nonostante questo, la prognosi è generalmente severa, con una mediana di sopravvivenza a 5 anni del 32% (58). La stratificazione mediante indici prognostici utilizzati nei linfomi a cellule B (e.g. IPI score) ha dimostrato un *overall survival* (OS) a 5 anni variabile dal 56% (IPI 0/1) al 25% (IPI 4/5). Recentemente, sono stati identificati parametri prognostici più caratteristici di AITL, che hanno portato alla produzione di uno *score* specifico per questa neoplasia (*AITL score*) (9).

L'AITL score si basa sulla valutazione integrata di: (i) età alla diagnosi ≥ 60 anni; (ii) *performance status* (ECOG) >2 ; (iii) elevati livelli sierici di $\beta 2$ -microglobulina; (iv) elevati livelli di proteina C reattiva. La combinazione di queste variabili identifica tre gruppi di rischio con *progression free survival* (PFS) del 41% (basso rischio: 0-1 variabili), 37% (rischio intermedio: 2 variabili) e 13% (alto rischio: 3-4 variabili) e OS del 63% (basso rischio), 54% (rischio intermedio) e 21% (alto rischio).

Per quanto riguarda l'assetto genetico, nessuna mutazione è specificamente associata alla prognosi di malattia. Nonostante questo, pazienti con mutazione

RHOA^{G17V} presentano quadri clinici più aggressivi con aumentata incidenza di sintomi B e di splenomegalia. L'impatto clinico di altre mutazioni è trascurabile, per quanto casi con mutazione di *IDH2* presentino caratteristiche istologiche e biologiche peculiari (presenza di numerose cellule di media/grande taglia con citoplasma chiaro; intensa espressione di *CD10* e *CXCL13*) (39,59).

Tra le variabili biologiche con potenziale impatto prognostico, elevati livelli di IL-10 sono stati associati a scarsa risposta alla chemioterapia e a inferiore OS (60). L'IL-10 è una citochina associata a risposte immunitarie Th2-mediate e promuove la formazione di un microambiente immunosoppressivo, anche attraverso il reclutamento di macrofagi con fenotipo M2 (i.e. CD163-positivi). In accordo con tali osservazioni, è stata riportata una significativa associazione tra ridotta OS e presenza di macrofagi CD163-positivi nel microambiente tumorale dell'AITL. In questo contesto, i macrofagi M2 potrebbero rappresentare anche un valido bersaglio terapeutico nei pazienti affetti da AITL.

Oltre all'IL-10 e alla presenza di macrofagi M2, anche i livelli di espressione di *FOXO1* nelle cellule neoplastiche potrebbero costituire un parametro biologico prognosticamente rilevante. Casi con ridotti livelli di tale fattore di trascrizione sono, infatti, associati a stadi avanzati di malattia alla diagnosi e a ridotto OS (61). Ciò è dovuto al fatto che l'inattivazione di *FOXO1* aumenta la proliferazione dei linfociti T CD4-positivi, favorendone la differenziazione in senso TFH, alterandone la sopravvivenza e promuovendo la progressione nel ciclo cellulare.

1.3.8 Terapia dell'AITL

Nonostante la presenza di caratteristiche cliniche e patologiche distintive, gli approcci terapeutici attualmente in uso per l'AITL sono simili a quelli applicati per tutti i PTCL. Tradizionalmente, la prima linea terapeutica si basa su agenti chemioterapici in combinazione, quali CHOP (ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone) e regimi CHOP-like (62). Questa strategia è tuttavia caratterizzata da bassi tassi di sopravvivenza a 5 anni (OS pari al 30%), principalmente a causa dell'elevata frequenza di recidive. Per ovviare a tali limiti sono stati identificati regimi terapeutici più aggressivi e terapie di consolidamento mediante trapianto autologo di cellule staminali (ASCT).

Per quanto riguarda terapie più aggressive dei classici regimi CHOP/CHOP-like, in pazienti *fit* di età <70 anni, l'aggiunta di etoposide ha mostrato un

miglioramento significativo della sopravvivenza libera da eventi a 3 anni (75% versus 51%), pur in assenza di chiari benefici in termini di OS (63). Nei pazienti anziani, invece, l'aggiunta di etoposide è sconsigliata, in quanto associata a un significativo aumento della tossicità correlata a terapia. I regimi per pazienti di età >70 anni tendono, quindi, ad essere meno intensivi e si focalizzano più sul miglioramento della sintomatologia che su intenti curativi.

Per quanto riguarda il consolidamento con ASCT, questo dovrebbe essere considerato alla prima remissione in tutti i pazienti che possono tollerarlo. Tale opzione terapeutica è stata, infatti, associata a *outcome* significativamente più favorevole rispetto alla sola chemioterapia, con OS e PFS a 5 anni dell'89% e del 79% rispettivamente (9). Anche in casi recidivati/refrattari, l'ASCT si è dimostrato utile e valido, con OS a 5 anni dell'80%. A causa della sua potenziale tossicità, l'opzione trapiantologica è tuttavia sconsigliata in pazienti anziani o con severe comorbidità.

Oltre ai regimi di chemioterapia convenzionale e all'ASCT, in anni recenti sono stati considerati nuovi approcci terapeutici basati su farmaci innovativi e su inibitori del checkpoint immunologico. Questi regimi mirano a inibire l'interazione tra linfociti T e B e/o l'attivazione del *signaling* del TCR. L'inibitore tirosinchinasico Dasatinib si è dimostrato efficace in modelli murini di AITL, con profili di tossicità soddisfacenti anche in trial clinici di fase I (64). Il meccanismo di azione di tale farmaco sembra correlato all'inibizione di multiple chinasi della famiglia Src (incluse *FYN* e *LCK*), coinvolte nell'attivazione della via del TCR. Allo stesso modo, inibitori di *BCL6* potrebbero essere utilizzati per future terapie mirate contro i linfociti TFH neoplastici, che esprimono ad alti livelli tale regolatore della trascrizione.

Un'altra area di interesse per la terapia dell'AITL riguarda gli inibitori dei checkpoint immunitari. Nella grande maggioranza dei casi, le cellule neoplastiche esprimono intensamente la molecola PD1. Tale recettore gioca un ruolo fondamentale nella migrazione delle cellule TFH e nell'attivazione della via di NF B. Esso potrebbe quindi svolgere un ruolo patogenetico di primo piano, costituendo un valido bersaglio terapeutico. Muovendo da tali osservazioni, sono stati promossi trial clinici con l'inibitore di PD1 Nivolumab, che hanno tuttavia portato a risultati deludenti. La terapia con Nivolumab ha infatti dimostrato un

incremento dei tassi di progressione di malattia, verosimilmente secondario a slatentizzazione di meccanismi di *escape* immunitario (65).

Nei casi a ricca componente B, una possibile opzione terapeutica potrebbe combinare regimi CHOP/CHOP-like con inibitori dei linfociti B (e.g. anticorpi monoclonali anti-CD20, come rituximab). In generale, tuttavia, la combinazione di CHOP e rituximab non ha mostrato significativi benefici in termini di *outcome*, con tassi di PFS paragonabili a quelli della sola terapia con CHOP (66).

Come visto precedentemente, la maggior parte dei pazienti con AITL presenta mutazioni di regolatori epigenetici quali *TET2*, *DNMT3A* o *IDH2*. Analogamente a quanto già in uso per le sindromi mielodisplastiche (MDS), si è quindi considerato l'utilizzo di agenti ipometilanti (e.g. 5-azacitidina) anche negli AITL (67). Gli agenti ipometilanti, infatti, contribuiscono a controbilanciare lo stato di ipermetilazione del DNA causato da mutazioni dei regolatori epigenetici, ripristinando un'espressione genica che ostacoli la biologia tumorale. Ciò potrebbe teoricamente valere ancor più negli AITL, dato l'elevato tasso di mutazioni di *TET2*, *DNMT3A* e *IDH2* in questi linfomi.

In linea con queste osservazioni, la somministrazione di 5-azacitidina in pazienti con AITL ha mostrato elevati tassi di risposta completa (anche maggiori rispetto a quelli osservati in altri PTCL) (68). In tale contesto, è rilevante notare come la risposta alle terapie non dipendesse dalla presenza di mutazioni di *TET2*, essendo riportate remissioni durature anche in casi *TET2 wildtype*. La 5-azacitidina potrebbe quindi rappresentare una valida opzione terapeutica in pazienti non candidabili a ASCT o con malattia recidiva/refrattaria (50).

Nonostante queste valide prospettive, la terapia dell'AITL e delle sue forme evolutive a DLBCL EBV+ resta gravata da elevati tassi di resistenza, recidiva e mortalità. Una più approfondita comprensione della biologia di questa patologia costituisce un requisito essenziale per l'implementazione di strategie terapeutiche innovative, che si traducano in un miglioramento della gestione clinica e in un effettivo beneficio per i pazienti.

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Obiettivi del presente studio sono:

- Descrivere le caratteristiche clinico-patologiche dei disordini linfoproliferativi a cellule B periferiche insorti in pazienti con AITL;
- Valutare il profilo mutazionale dei disordini linfoproliferativi a cellule B periferiche, con speciale riferimento a geni frequentemente mutati in corso di AITL;
- Identificare pattern di malattia in base a presentazione clinica, profilo mutazionale e status di EBV.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione dello studio

Il presente studio retrospettivo multicentrico ha considerato una coorte di pazienti affetti da AITL, nei quali sia stato documentato un disordine linfoproliferativo a cellule B periferiche (B-LPD) o proliferazioni plasmacellulari neoplastiche sincrone o metacrone al linfoma T. I centri partecipanti allo studio comprendevano le UOC di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedale Università di Padova (n= 13), dell'ASST Spedali Civili di Brescia (n= 7), dell'Ospedale San Bortolo di Vicenza (n= 5), dell'Ospedale Policlinico di Milano (n= 2) e l'Unità di Ematopatologia dell'IRCSS Policlinico Sant'Orsola di Bologna (n= 5).

Ai fini dello studio, sono stati adottati i seguenti criteri di inclusione: (i) diagnosi istologica di AITL o di altro disordine linfoproliferativo a cellule TFH (in sedi extra-cutanee); (ii) diagnosi istologica di B-LPD (sincrona o metacrona all'AITL); (iii) disponibilità di materiale adeguato alla rivalutazione istologica; (iv) disponibilità di dati anagrafici e clinici, relativi alla sede della lesione. In totale, 32 casi hanno soddisfatto i criteri di inclusione.

3.2 Raccolta e valutazione dei dati clinici

Per ciascun caso sono stati considerati (ove disponibili) i seguenti dati clinici: (i) sesso ed età alla diagnosi; (ii) presenza/assenza di sintomi sistemici; (iii) sede della biopsia al momento della diagnosi di AITL e B-LPD; (iv) stadio dell'AITL alla diagnosi; (v) valori emocromocitometrici al momento della diagnosi; (vi) relazione temporale tra la diagnosi di AITL e B-LPD (lesioni sincrone o metacrone); (vii) intervallo temporale tra la diagnosi di AITL e B-LPD metacroni; (viii) terapia effettuata; (ix) durata del follow-up; (x) *outcome* ed eventuali cause del decesso.

Tali dati sono stati raccolti dalle cartelle cliniche delle UOC di Ematologia dei centri partecipanti allo studio o, in assenza di documentazione clinica più esaustiva, da quanto riportato sulle richieste di esame istologico inviate ai laboratori di Anatomia Patologica.

3.3 Valutazione istologica

I preparati istologici dei campioni di AITL e B-LPD sono stati rivalutati da due patologi esperti di patologie onco-ematologiche, non a conoscenza delle diagnosi originali. La rivalutazione ha considerato i criteri diagnostici contenuti nella Classificazione WHO 2022 e nell'International Consensus Classification delle neoplasie linfoidi (1,69).

Per i campioni di AITL, sono stati considerati i seguenti parametri morfologici e immunofenotipici: (i) entità del sovvertimento linfonodale; (ii) pattern istologico della malattia (i.e. pattern I: minimo sovvertimento dell'architettura nodale con linfociti TFH neoplastici disposti attorno a follicoli iperplastici; pattern II: sovvertimento dell'architettura nodale con residui follicoli linfoidi distorti; pattern III: completo sovvertimento dell'architettura nodale con iperplasia di vasi di piccolo calibro e follicoli linfoidi marginalizzati/atrofici); (iii) fenotipo della popolazione TFH (espressione di marker pan-T, di CD30 e di marker di differenziazione TFH, quali PD1, CD10, BCL6, ICOS e CXCL13); (iv) presenza/assenza di blasti B; (v) fenotipo dei blasti B (marker pan-B e status di EBV, valutato mediante ibridazione in situ per EBER); (v) indice proliferativo della popolazione neoplastica T.

Per i campioni di B-LPD/proliferazioni plasmacellulari, sono stati considerati i seguenti parametri morfologici e fenotipici: (i) pattern di crescita (interstiziale, nodulare o diffuso); (ii) entità dell'infiltrato linfoide (unifocale; multifocale o diffuso); (iii) composizione citologica (presenza e caratteristiche dei blasti di grande taglia; presenza di linfociti maturi di piccola taglia, di linfociti plasmocitoidi e/o di plasmacellule); (iv) fenotipo della popolazione B/plasmacellulare (espressione di marker pan-B e/o plasmacellulari; espressione di CD10, Bcl6, Bcl2, MUM1, c-Myc e CD30; valutato mediante ibridazione in situ per EBER); (v) indice proliferativo della popolazione B/plasmacellulare. A seguito della rivalutazione istologica, ciascun caso è stato classificato in una delle seguenti categorie diagnostiche: (i) DLBCL (EBV-positivo o EBV-negativo); (ii) disordine linfoproliferativo polimorfo a cellule B, EBV-positivo; (iii) neoplasia plasmacellulare; (iv) espansione clonale di blasti B (i.e. fase evolutiva iniziale a DLBCL, EBV-positivo o EBV-negativo).

3.4 Caratterizzazione immunoistochimica

Il fenotipo delle popolazioni neoplastiche è stato valutato sui preparati istologici allestiti al momento della diagnosi, utilizzando coloratori automatizzati (BOND-MAX system - Leica Biosystems per l'UOC di Padova e per l'UOC di Brescia). La caratterizzazione immunostochimica è stata eseguita su sezioni dello spessore di 4 µm, ottenute da tessuto fissato in formalina/incluso in paraffina. Le UOC di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedale Università di Padova e dell'ASST Spedali Civili di Brescia hanno utilizzato rispettivamente i seguenti anticorpi primari : anti-CD2 (AB75, Dako; AB75, Leica Biosystems), anti-CD3 (LN10, Leica Biosystems), anti-CD5 (4C7, Leica Biosystems), anti-CD7 (LP15, BioCare; LP15, Leica Biosystems), anti-CD4 (4B12, Dako; 4B12 Leica Biosystems), anti-CD8 (C8/144B, Dako; C8/144B, Agilent), anti-BCL6 (LN22, Leica Biosystems; LN22, Saggio), anti-CD10 (DAK-CD10, Dako; 56C6, Leica Biosystems), anti-PD1 (CAL20, Leica Biosystems; NAT105, Cell Marque), anti-ICOS (RM417, BIO SB), anti-CD30 (JCM182, Leica Biosystems), anti-CD20 (L26, Dako; L26 Leica Biosystems), anti-CD21 (2G9, Leica Biosystems; 1F8, Dako), anti-CD23 (1B12, Leica Biosystems) e anti-Ki67 (SP6, Cell Marque; 30-9, Ventana). I campioni di B-LPD sono stati studiati invece per i seguenti anticorpi primari: anti-CD20 (L26, Dako; L26 Leica Biosystems), anti-CD79a (JCB117, Leica Biosystems; HM47/A9, BioCare), anti-PAX5 (DAK-PAX5, Dako; 24/PAX5, BD Biosciences), anti-CD10 (DAK-CD10, Dako; 56C6, Leica Biosystems), anti-BCL6 (LN22, Leica Biosystems; LN22, Saggio), anti-MUM1(MUM1p, Dako), anti-BCL2 (124, Dako; 124, Cell Marque), anti-CD138 (MI15, Dako), anti-CD30 (JCM182; Leica Biosystems), anti-CD21 (2G9, Leica Biosystems; 1F8, Dako), anti-CD23 (1B12, Leica Biosystems), anti-Ki67 (SP6, Cell Marque; 30-9, Ventana) e rapporto catene leggere kappa (polyclonal, Dako) e lambda (polyclonal, Dako).

La positività per EBV è stata valutata tramite metodica di ibridazione in situ per EBER (EBER-ISH), utilizzando la sonda Bond ready-to-use CISH EBER Probe.

3.5 Analisi molecolari

Le analisi molecolari sono state condotte mediante metodiche di Next Generation Sequencing (NGS) su piattaforma Illumina in campioni con adeguata preservazione degli acidi nucleici. In totale, 24 campioni sono stati sottoposti a profilazione molecolare.

Le analisi NGS sono state realizzate applicando: (i) un pannello *customed* che considerasse mutazioni di TET2 (*whole gene*), DNMT3A (*whole gene*), IDH2 (codone 173) e *RHOA*^{G17V}; (ii) il pannello SOPHiA Lymphoma Solution (SOPHiA Genetics), comprendente 73 geni frequentemente mutati in neoplasie linfoidi. Ognuna delle mutazioni rilevate è stata identificata secondo la nomenclatura Human Genome Variation Society (HGVS), considerandone anche la *variant allele frequency* (VAF). La patogenicità delle mutazioni è stata ricavata sulla base dei database COSMIC (70) e VarSome (71).

3.6 Valutazione statistica e approvazione del Comitato Etico competente

Ai fini dello studio sono state applicate analisi di statistica descrittiva (frequenza e distribuzione delle variabili cliniche, istologiche e molecolari). La ridotta numerosità delle singole categorie di B-LPD/proliferazioni plasmacellulari non ha consentito analisi statistiche volte al confronto tra sottogruppi di malattia.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Territoriale dell'Area Centro Est Veneto (CET-ACEV; codice identificativo dello studio: 5946/AO/24; data di approvazione: 08/04/2024) ed è stato condotto in accordo alla Dichiarazione di Helsinki e nel rispetto della normativa vigente sulla tutela della privacy e dei dati sensibili.

4. RISULTATI

4.1 Caratteristiche cliniche della popolazione dello studio

Il presente studio ha considerato 32 casi di proliferazioni B/plasmacellulari in pazienti affetti da linfomi a cellule TFH (AITL: 29/32 casi; PTCL con fenotipo TFH: 3/32 casi). La popolazione dello studio comprendeva 19 pazienti di sesso maschile e 13 di sesso femminile (rapporto M:F pari a 1.5:1) con età mediana alla diagnosi di 73.0 anni (range: 53.0-89.5 anni).

In 9/32 (28.1%) casi erano disponibili informazioni cliniche dettagliate al momento della diagnosi di AITL. Sintomi sistemici (febbre, calo ponderale, sudorazioni notturne) erano presenti in 8/9 (88.9%) casi. Le analisi di laboratorio al momento della diagnosi hanno documentato leucocitosi in 1/9 (11.1%), anemia in 7/9 (77.8%) e piastrinopenia in 1/9 (11.1%) casi. Epato/splenomegalia era presente in 3/9 (33.3%) casi mentre adenopatie diffuse sono state documentate in 9/9 (100.0%) pazienti. Uno stadio avanzato di malattia (stadio III/IV) era presente in 14/15 (93.3%) pazienti alla diagnosi.

Proliferazioni linfoidi B o plasmacellulari sono state documentate al momento della diagnosi di AITL in 23/32 (71.9%) casi. In tutti questi casi, lesioni TFH e B/plasmacellulari erano presenti nel medesimo campione biotico. In 3/32 (9.4%) casi, la diagnosi di B-LPD ha preceduto quella di AITL (intervallo mediano tra la diagnosi di B-LPD e AITL: 15 mesi; range: 12-29 mesi), mentre in 6/32 (18.8%) casi il B-LPD si è sviluppato dopo il riscontro di AITL (intervallo mediano tra la diagnosi di AITL e B-LPD: 19 mesi; range: 11-92 mesi) (Tabella 1).

In 17/32 casi (53.1%) è stato possibile ricavare il regime terapeutico adottato per il paziente. In totale, 5/17 (29.4%) pazienti sono stati trattati con R-CHOP, 3/17 (17.6%) con R-COMP, 2/17 (11.8%) con CHOP-E, 2/17 (11.8%) con ESHAP, 1/17 (5.9%) con R-DHAOx, 1/17 (5.9%) con GemOD e 1/17 (5.9%) con GDP. In un caso (linfoma TFH tonsillare con co-esistente proliferazione plasmacellulare), è stata adottata una strategia di *watchful waiting* dopo tonsillectomia, data la paucisintomaticità del quadro clinico e l'assenza di lesioni extra-tonsillari. In un altro caso la terapia è stata effettuata esclusivamente con Rituximab a scopo palliativo. Tre casi sono stati sottoposti a ASCT dopo prima remissione.

Tabella I. Caratteristiche clinico-patologiche dei B-LPD associati ad AITL	
Variabili	Distribuzione dei casi
Sesso (%)	
<i>Maschi</i>	19 (59.4)
<i>Femmine</i>	13 (40.6)
Età mediana alla diagnosi (anni)	73.0 (53.0-89.5)
Sede (%)	
<i>Nodale</i>	31 (96.9)
<i>Extranodale</i>	1 (3.1)
Tipo di B-LPD (%)	
<i>DLBCL</i>	17 (53.1)
<i>Disordine polimorfo a cellule B</i>	6 (18.8)
<i>Proliferazione plasmacellulare</i>	4 (12.5)
<i>Proliferazione clonale di blasti B</i>	4 (12.5)
<i>Proliferazione marginal zone-like</i>	1 (3.1)
Relazione con AITL (%)	
<i>Sincrono</i>	23 (71.9)
<i>Metacrono</i>	9 (28.1)
Stato di EBV - EBER (%)	
<i>Positivo</i>	23 (71.9)
<i>Negativo</i>	9 (28.1)
Mutazione <i>RHOA</i>^{G17V}	
<i>Numero mutazioni</i>	2
<i>burden mediano (range)</i>	6.0 (5.0-6.0)
Mutazioni di <i>TET2</i>	
<i>Numero mutazioni</i>	12
<i>burden mediano (range)</i>	34.0 (7.0-52.0)
Mutazioni di <i>DNMT3A</i>	
<i>Numero mutazioni</i>	1
<i>burden mediano (range)</i>	24.2 (-)
Mutazioni di <i>IDH2</i>	
<i>Numero mutazioni</i>	2
<i>burden mediano (range)</i>	9.8 (5.8-13.7)

Dopo un *follow-up* mediano di 15 mesi, 9/15 (60.0%) pazienti erano deceduti a causa della malattia. Nei restanti casi, 4/15 (26.7%) pazienti risultavano ancora in vita mentre 2/15 (13.3%) pazienti erano deceduti per altre cause.

4.2 Caratteristiche istologiche dei campioni di linfomi a cellule TFH

La rivalutazione istologica dei campioni di linfoma TFH (AITL o PTCL con fenotipo TFH) ha documentato parziale/totale sovvertimento dell'architettura nodale/tonsillare in tutti i casi. Negli AITL, un *pattern* istologico di tipo II è stato documentato in 1/29 (3.4%) casi e un *pattern* III in 28/29 (96.6%) casi. Nessun caso aveva *pattern* istologico di tipo I. Nei casi di PTCL a fenotipo TFH, la popolazione neoplastica si presentava in ampi aggregati confluenti attorno a centri germinativi iperplastici.

In tutti i casi di AITL la popolazione TFH era costituita da linfociti maturi di piccola/media taglia (anche mitoticamente attivi) con citoplasma chiaro e contorno nucleare irregolare. Tali cellule erano disperse in un ricco infiltrato infiammatorio costituito da plasmacellule, granulociti eosinofili e istiociti (Figura 1, A-C). Reti distorte di FDC erano presenti in 20/29 (69.0%) casi, mentre blasti B EBV-positivi sono stati documentati in 15/29 (51.7%) casi. Nel caso di PTCL tonsillare con fenotipo TFH, la popolazione neoplastica aveva caratteristiche citologiche sovrapponibili a quelle degli AITL ma il microambiente infiammatorio era limitato a rari istiociti e granulociti eosinofili, senza evidenza di FDC distorte.

La caratterizzazione immunoistochimica della popolazione TFH ha documentato positività per CD2, CD3, CD5 e PD1 in tutti i casi. Difettività per CD7 è stata documentata in 4/14 (28.6%) casi. CD4 era espresso in 21/22 (95.5%) casi, CD8 in 19/21 (90.5%) casi, CD10 in 16/22 (72.7%) casi, Bcl6 in 21/23 (91.3%) casi, ICOS in 8/9 (88.9%) casi e CD30 in 12/15 (80.0%) casi. L'indice proliferativo mediano della popolazione TFH neoplastica è risultato pari a 30% (range: 7-90%) (Figura 1, D-H).

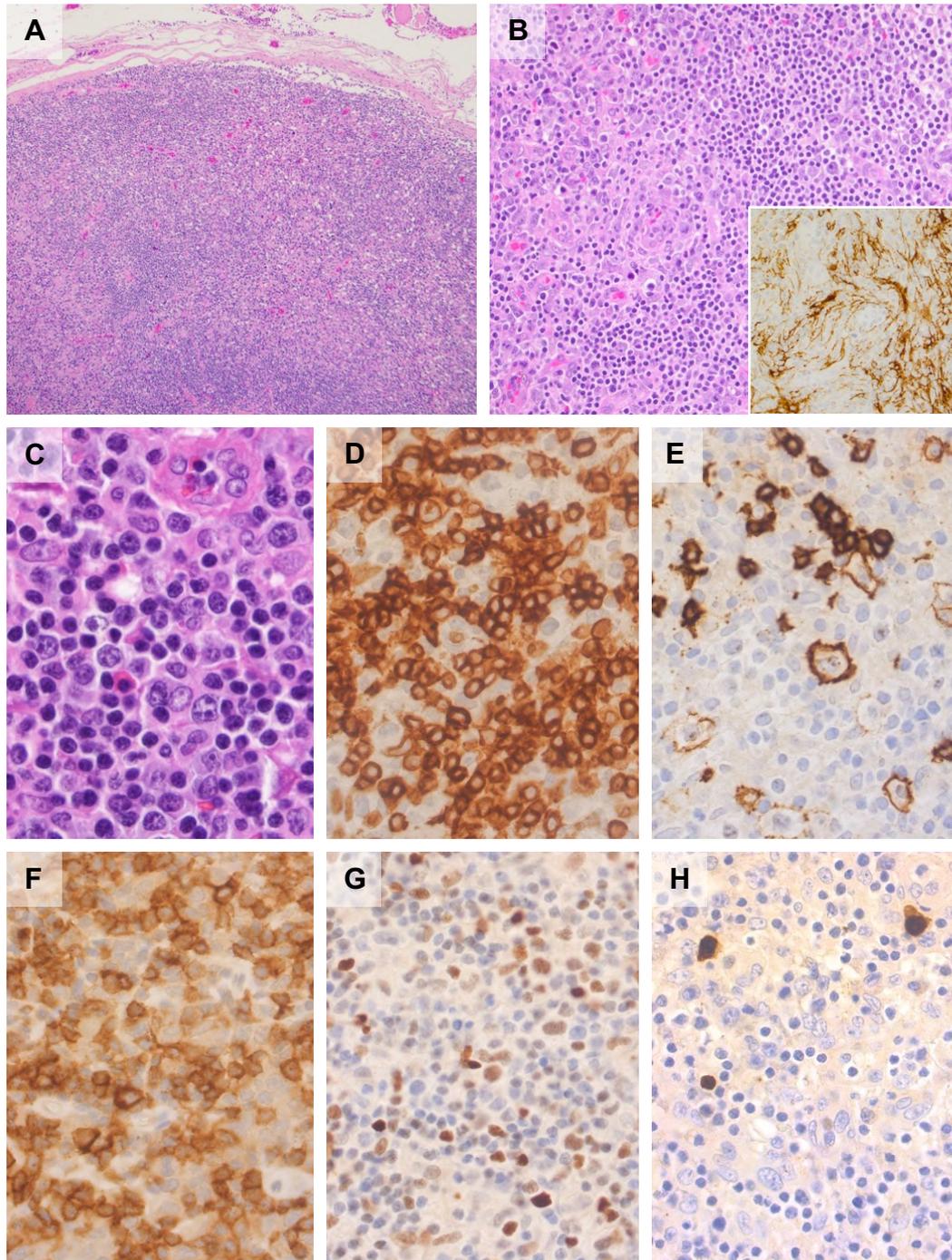


Figura 1. Caratteristiche istologiche e immunoistochimiche dell'AITL. La valutazione istologica di linfonodi coinvolti da AITL mostra un parziale o totale sovvertimento architetturale (A-B) con ampie reti distorte di FDC CD23-positivo (B - *inserto*). Le cellule TFH si presentano come linfociti maturi di piccola/media taglia con citoplasma chiaro e nucleo irregolare (C). Le cellule T neoplastiche risultano positive per CD3 (D), PD1 (F) e BCL6 (G). Nel contesto della neoplasia sono presenti blasti B di grande taglia, positivi per CD20 (E) ed EBER (H). (Colorazione con ematossilina-eosina, immunoperossidasi e ibridazione *in situ* per EBV [EBER]; ingrandimento originale 5x, 20x, 40x, 63x).

Tabella II: Caratteristiche clinico-patologiche e molecolari dei B-LPD associati ad AITL				
Variabili	DLBCL (n=17)	LPD polimorfo B (n=6)	Proliferazione plasmacellulare (n=4)	Proliferazione di blasti B (n=4)
Età mediana alla diagnosi (anni)	72.7 (59.3-79.0)	65.0 (55.2-89.5)	75.8 (74.3-87.8)	79.3 (72.5-80.8)
Rapporto M:F	1.1:1	1	3:1	3:1
Sede (%)				
<i>Nodale</i>	16 (94.1)	6 (100.0)	4 (100.0)	4 (100.0)
<i>Extranodale</i>	1 (5.9)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
Relazione con AITL (%)				
<i>Sincrono</i>	11 (64.7)	3 (50.0)	4 (100.0)	4 (100.0)
<i>Metacrono</i>	6 (35.3)	3 (50.0)	0 (-)	0 (-)
Stato di EBV (%)				
<i>Positivo</i>	12 (70.6)	6 (100.0)	1 (25.0)	3 (75.0)
<i>Negativo</i>	5 (29.4)	0 (-)	3 (75.0)	1 (25.0)
Indice proliferativo (%)	70 (40-90)	65 (60-85)	15 (5-25)	50 (50-70)
Analisi mutazionali (%)				
<i>RHOA</i>	1 (5.9)	1 (16.7)	0 (-)	0 (-)
<i>TET2</i>	4 (23.5)	1 (16.7)	1 (25.0)	1 (25.0)
<i>DNMT3A</i>	0 (-)	0 (-)	0 (-)	1 (25.0)
<i>IDH2</i>	0 (-)	0 (-)	1 (25.0)	1 (25.0)

4.3 Caratteristiche delle proliferazioni B/plasmacellulari associate a AITL

La rivalutazione istologica dei casi di B-LPD e proliferazioni plasmacellulari ha documentato una varietà di lesioni, che comprendevano: (i) 17/32 (53.1%) casi di DLBCL EBV-positivi o EBV-negativi; (ii) 6/32 (18.8%) casi di disordini linfoproliferativi B polimorfi, EBV-positivi; (iii) 4/32 (12.5%) proliferazioni plasmacellulari del tipo plasmocitoma extra-osseo; (iv) 4/32 (12.5%) espansioni clonali di blasti B (verosimile fase di evoluzione iniziale a DLBCL) (Tabella 2). Un caso, infine, risultava difficilmente classificabile, in quanto costituito da una proliferazione B di basso grado a spiccata differenziazione plasmacellulare con discreta quota di blasti B EBV-negativi (possibile proliferazione del tipo linfoma della zona marginale con aspetti di accelerazione).

4.3.1 Caratteristiche istologiche dei DLBCL in AITL

Per quanto riguarda i DLBCL, in 11/17 (64.7%) casi la neoplasia era sincrona all'AITL, in 3/17 (17.6%) casi ha preceduto l'AITL e in 3/17 (17.6%) lo ha seguito. La maggior parte dei casi (16/17 [94.1%]) è stata documentata su biopsie linfonodali. Un caso è stato invece diagnosticato in corrispondenza di una perforazione del grosso intestino, verificatasi in corso di chemioterapia per il linfoma T.

La valutazione morfologica ha documentato una citologia mista (centroblastica/immunoblastica) in 13/17 (76.5%) casi e plasmoblastica in 4/17 (23.5%) casi. Nessun caso ha dimostrato morfologia blastoide. Il pattern di crescita della popolazione neoplastica era diffuso in tutti i casi. In 6/17 (35.3%) campioni la proliferazione era multifocale, nel contesto di linfonodi prevalentemente interessati da AITL. Nei restanti casi (11/17 [64.7%]), il DLBCL costituiva la componente neoplastica prevalente, senza chiara evidenza di AITL. Nel caso diagnosticato in corrispondenza della perforazione intestinale, il DLBCL era associato a una proliferazione polimorfa di linfociti maturi di piccola taglia, plasmacellule e linfociti plasmocitoidi, senza evidenza di cloni AITL.

La caratterizzazione immunoistochimica ha documentato positività per CD20 e/o altri *marker* di linea B in 17/17 (100.0%) casi. Bcl6 e MUM1 erano espressi nella maggior parte dei casi (7/11 [63.6%] e 10/11 [90.9%], rispettivamente), mentre espressione di CD10 è stata documentata in 1/12 (8.3%) casi. L'indice proliferativo mediano della popolazione neoplastica era pari a 70% (range: 40-90%).

Positività all'ibridazione *in situ* di EBV (EBER) è stata documentata in 12/17 (70.6%) casi. In 15/17 (88.2%) casi lo stato di EBV era concorde a quello dei blasti B documentati nel contesto dell'AITL. In 1/17 (5.9%) casi, invece, il DLBCL era EBER-negativo, a fronte della positività per EBV nei blasti B dell'AITL. Nel caso a presentazione intestinale, positività per EBV è stata documentata nel DLBCL e nella proliferazione polimorfa ad esso associata, ma non nei blasti B dell'AITL (Figura 2).

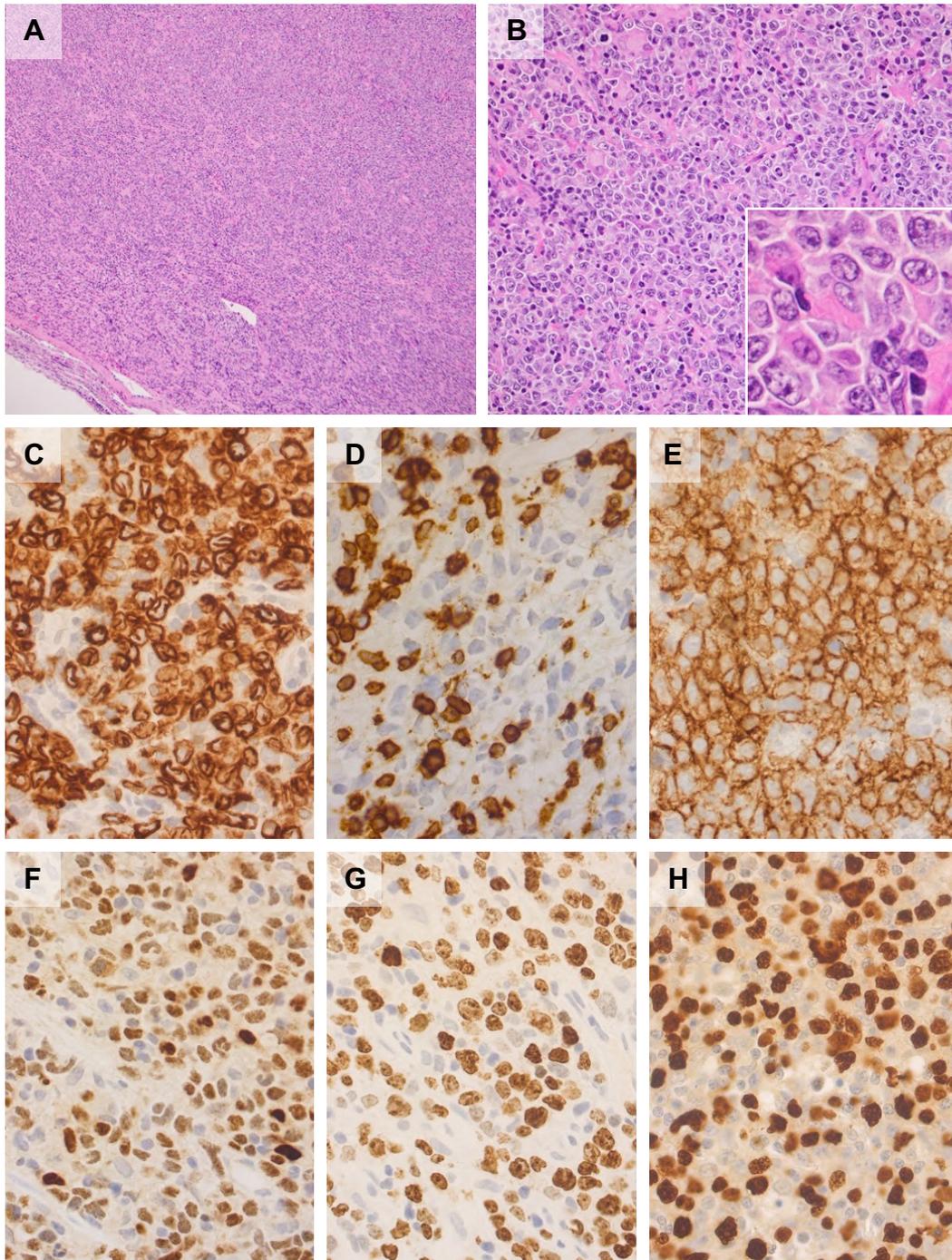


Figura 2. Caratteristiche istologiche e immunoistochimiche dei DLBCL associati ad AITL. I DLBCL associati ad AITL presentano pattern di crescita diffuso e citologia mista o plasmoblastica (A-B; *inserto*). La caratterizzazione immunoistochimica mostra positività per CD20 (C) e variabile positività per CD30 (E) e MUM1 (F) mentre le cellule T di accompagnamento risultano positive per CD3 (D). L'indice proliferativo (reazione per Ki67) è elevato (G). EBV può essere documentato in una quota di casi mediante ibridazione *in situ* per EBV (H). (Colorazione con ematossilina-eosina, immunoperossidasi e ibridazione *in situ* per EBV; ingrandimento originale 5x, 20x, 40x, 63x).

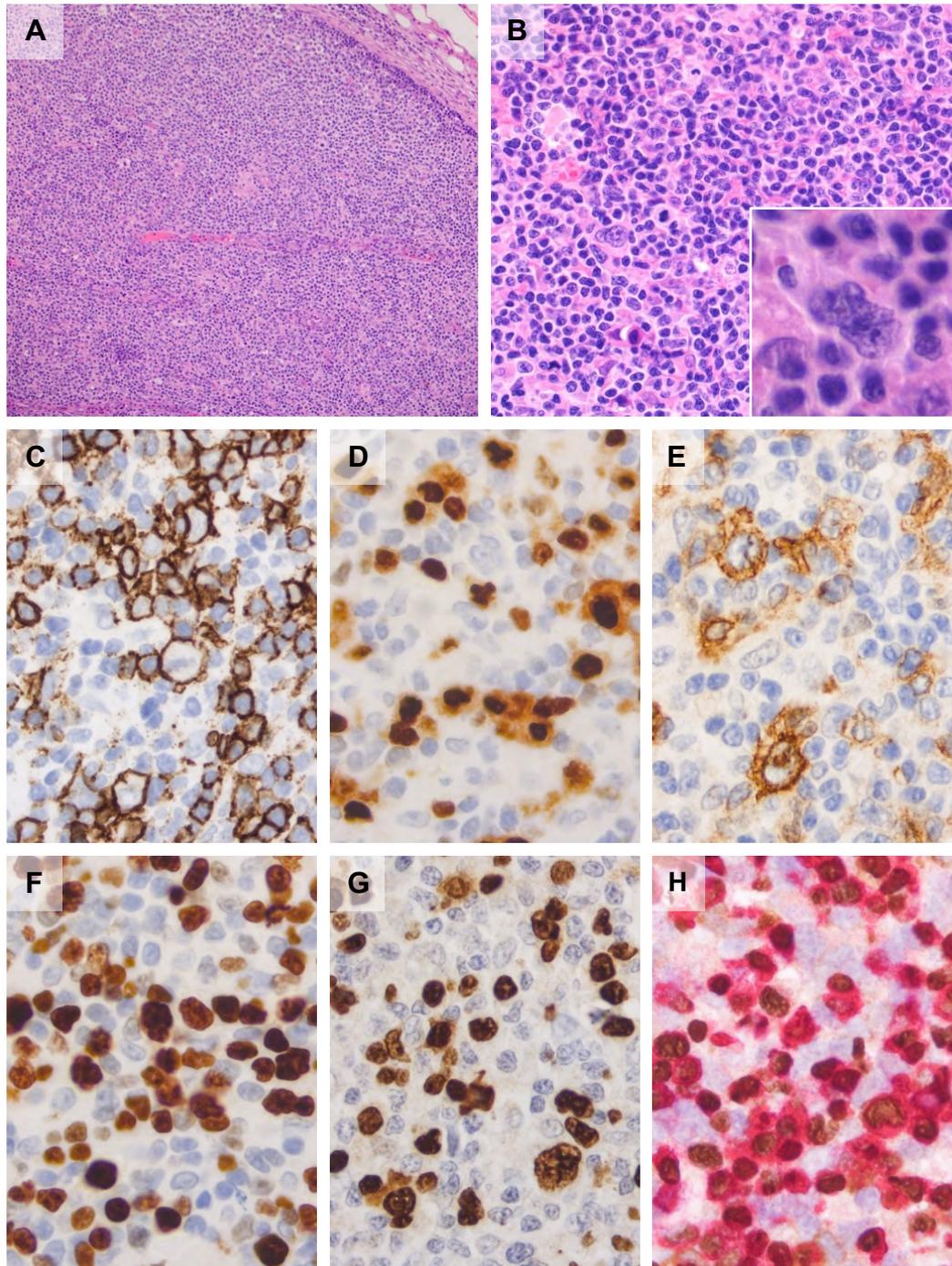


Figura 3. Caratteristiche istologiche e immunoistochimiche dei disordini polimorfi B associati ad AITL. La valutazione istologica mostra proliferazioni linfoidi diffuse con quote variabili di blasti di grande taglia, linfociti maturi di piccola taglia, plasmacellule e linfociti plasmocitoidi (A-B; *inserto*). La caratterizzazione immunoistochimica mostra positività eterogenea per CD20 (C), MUM1 (D) e CD30 (E). L'indice proliferativo valutato con Ki67 (F) risulta elevato in tutti i casi. La reazione di ibridazione *in situ* per EBER risulta positiva in cellule di dimensioni variabili (G), tutte di derivazione B (H; doppia colorazione per CD79a in rosso ed EBER in marrone) (Colorazione con ematossilina-eosina, immunoperossidasi e ibridazione *in situ* per EBV; ingrandimento originale 10x, 40x, 63x).

4.3.2 Caratteristiche istologiche dei disordini polimorfi a cellule B in AITL

Tra le forme di B-LPD polimorfi, 3/6 (50.0%) casi sono stati documentati come lesioni sincrone all'AITL mentre nei rimanenti casi la neoplasia B ha seguito l'AITL. La valutazione istologica ha documentato una proliferazione linfoide a pattern di crescita diffuso, costituita da quote variabili di blasti di grande taglia (anche sternbergoidi), nel cui contesto erano presenti linfociti maturi di piccola taglia, plasmacellule e linfociti plasmocitoidi.

La caratterizzazione immunoistochimica ha documentato positività eterogenea per CD20, a seconda del grado di differenziazione plasmacellulare della popolazione linfoide. CD79a e MUM1 sono risultati positivi in tutti i casi (6/6 [100.0%]). Debole espressione di BCL6 è stata documentata in 2/6 (33.3%) casi. CD10 era invariabilmente negativo. Positività per EBER era presente in tutti i casi ed è stata documentata in blasti di grande taglia, in plasmacellule e in linfociti maturi di piccola taglia. L'indice proliferativo era elevato (positività mediana per Ki67: 65%; range: 60-85%) (Figura 3).

4.3.3 Caratteristiche istologiche delle proliferazioni plasmacellulari

Proliferazioni plasmacellulari con caratteristiche di plasmocitoma extra- osseo sono state documentate in quattro casi. In ognuno, esse erano sincrone al linfoma a cellule TFH e in contiguità a questo. Un caso si presentava come massa tonsillare bilaterale (caso associato al PTCL a fenotipo TFH nella stessa sede). I rimanenti casi sono stati invece documentati nel contesto di un AITL.

La valutazione istologica ha documentato plasmacellule mature con pattern di crescita diffuso. La caratterizzazione immunoistochimica delle plasmacellule ha dimostrato diffusa positività per CD138 e negatività per CD20, CD56 e Ciclina D1. Restrizione per le catene leggere kappa è stata documentata in un caso (adenopatia laterocervicale in AITL). Il caso a presentazione tonsillare ha invece dimostrato negatività per le catene leggere delle immunoglobuline e diffusa positività per le catene pesanti delle IgG. La maggior parte dei casi (3/4 [75.0%]) si è dimostrata negativa all'ibridazione *in situ* per EBV (EBER). Tutti i casi presentavano indice proliferativo medio-basso (positività mediana per Ki67: 15%; range: 5-25%). (Figura 4).

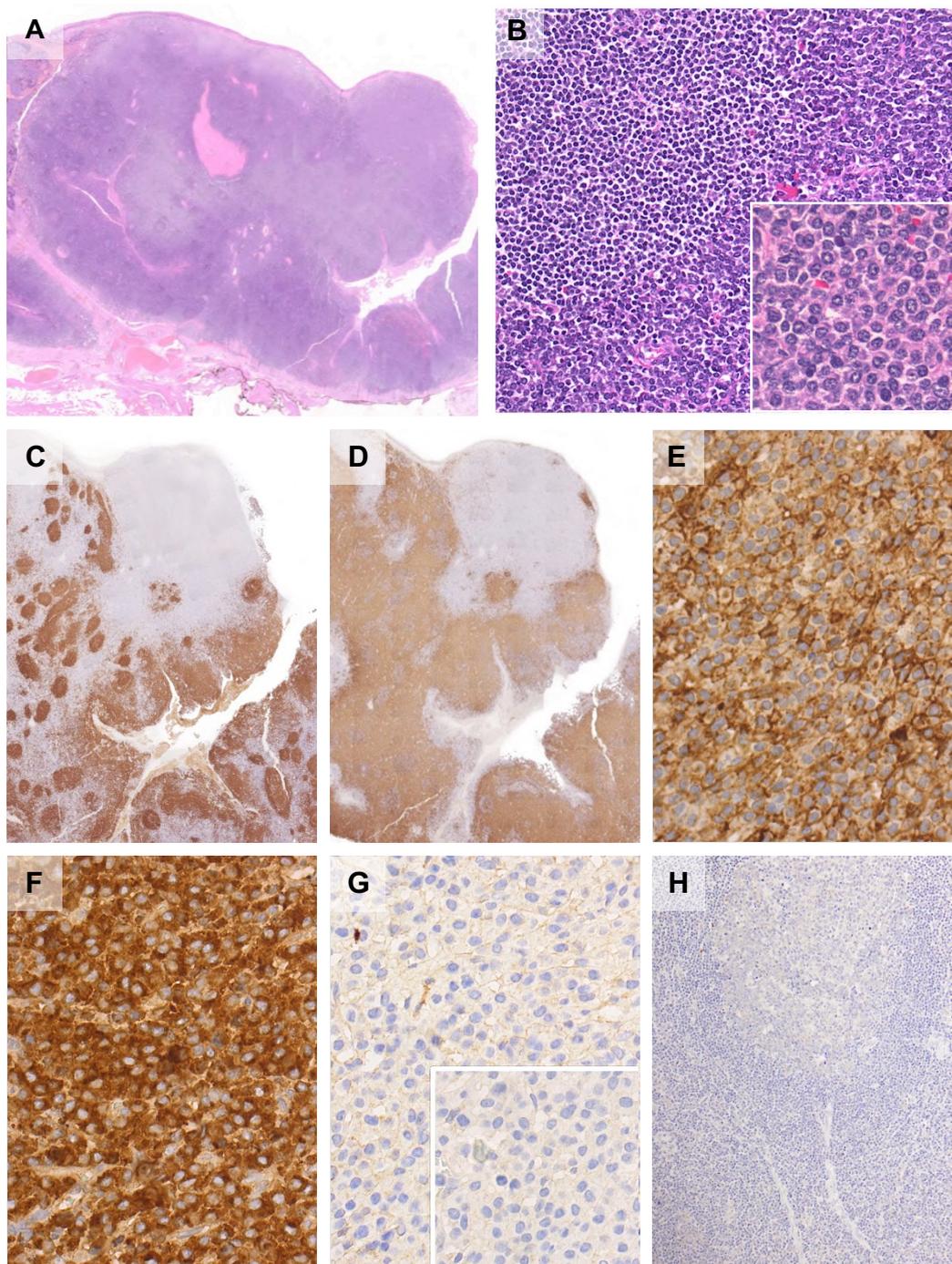


Figura 4. Caratteristiche istologiche e immunoistochimiche delle proliferazioni plasmacellulari associate ad AITL. La valutazione istologica del tessuto tonsillare ha documentato aggregati nodulari di plasmacellule adiacenti a follicoli iperplastici e a zone paracorticali espanse (A-B; *inserto*). Tali aggregati erano ben visibili come aree negative per CD20 (C) e CD3 (D) e positive all'immunoreazione per CD138 (E). Nel caso in esame, le plasmacellule erano diffusamente positive per le catene pesanti delle IgG (F) con negatività per le catene leggere kappa (G) e lambda (G - *inserto*) delle immunoglobuline. L'ibridazione *in situ* per EBV (EBER) è risultata negativa (H) (Colorazione con ematossilina-eosina, immunoperossidasi e ibridazione *in situ* per EBV; ingrandimento originale 5x, 20x, 40x, 63x).

4.3.4 Caratteristiche istologiche delle proliferazioni clonali di blasti B

In 4/32 (12.5%) casi, sono state documentate proliferazioni clonali di blasti B di grande taglia che, in considerazione della loro focalità e del pattern di crescita vagamente nodulare, non soddisfacevano i criteri morfologici minimi per la diagnosi di DLBCL. Tali casi sono stati documentati solo in linfonodi ed erano tutti associati a un concomitante AITL.

La popolazione B era costituita da elementi di grande taglia mitoticamente attivi, a morfologia centroblastica/immunoblastica con cromatina grossolanamente dispersa ed evidenti nucleoli. La caratterizzazione immunoistochimica ha documentato un profilo IHC analogo a quello dei DLBCL, con positività per CD20 e/o altri *marker* di linea B in 4/4 (100.0%) casi. Bcl6 e MUM1 erano espressi rispettivamente in 3/4 (75.0%) casi e 4/4 (100.0%) casi, mentre espressione di CD10 è stata documentata in 1/4 (25.0%) casi. L'indice proliferativo mediano della popolazione neoplastica era pari a 50% (range: 50-70%). Positività all'ibridazione *in situ* per EBV (EBER) è stata documentata in 3/4 (75.0%) casi (Figura 5).

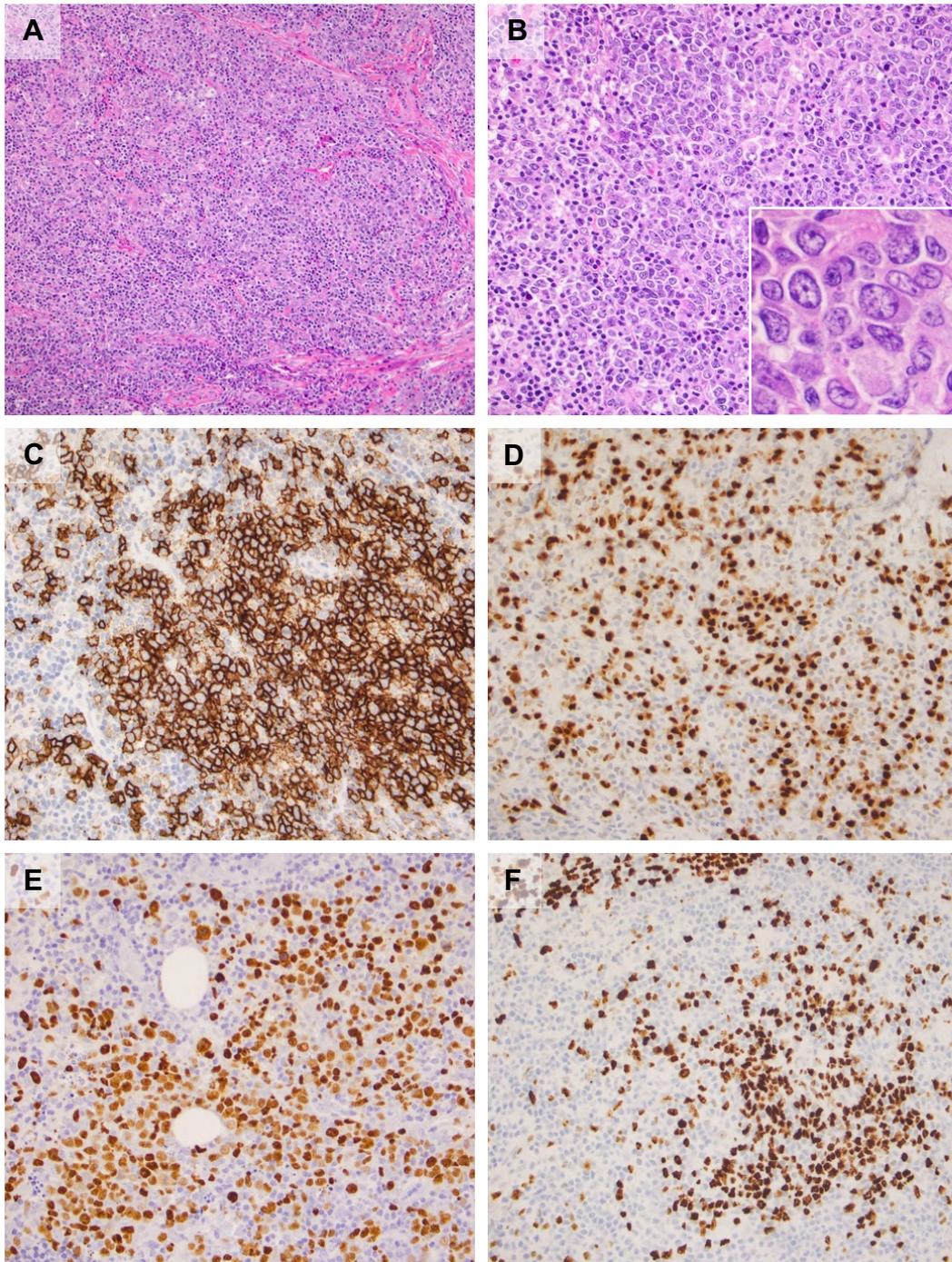


Figura 5. Caratteristiche istologiche e immunoistochimiche delle proliferazioni clonali di blasti B associate ad AITL. Le proliferazioni blasti B si presentano come aggregati nodulari di elementi di grande taglia, mitoticamente attivi, con morfologia centroblastica/immunoblastica, cromatina grossolanamente dispersa ed evidenti nucleoli (A-B; *inserto*). La caratterizzazione immunoistochimica mostra positività per CD20 (C) e MUM1 (D). EBV può essere documentato in una quota di casi mediante ibridazione *in situ* per EBER (E). L'indice proliferativo (valutato tramite Ki67) è elevato (F). (Colorazione con ematossilina-eosina, immunoperossidasi e ibridazione *in situ* per EBV; ingrandimento originale 10x, 40x, 63x).

4.4 Profilo molecolare degli AITL e delle proliferazioni B/plasmacellulari

Analisi di profilazione estesa mediante NGS sono state eseguite in un totale di 12 disordini linfoproliferativi B/plasmacellulari, associati ad AITL. In 8 casi è stato possibile effettuare il confronto tra mutazioni presenti nei campioni di AITL e nelle corrispettive proliferazioni di derivazione B.

Tra i B-LPD, 9/12 (75.0%) casi hanno mostrato mutazioni patogeniche in *TET2* e *DNMT3A* con *burden* allelico variabile da basso (<10%) a medio elevato (fino al 50%). In particolare, sono state riscontrate mutazioni di *TET2* in 7/12 (58.3%) casi, di *DNMT3A* in 1/12 (8.3%) casi e di *IDH2* in 2/12 (16.7%) casi. Mutazioni multiple e concorrenti di *TET2* sono state riscontrate in 4 casi. Mutazioni di *RHOA*^{G17V} erano invece presenti in 2/12 (16.7%) casi, entrambi con basso *burden* allelico (5.3% e 6.6%). Tale reperto suggerisce la presenza di una minima quota T neoplastica nel contesto della proliferazione linfoide a prevalente componente B.

Per quanto riguarda la distribuzione delle mutazioni in base all'istotipo di malattia, i DLBCL EBV+/EBV- presentavano mutazioni di *TET2* in 4/7 (57.1%) e di *RHOA* in 1/7 (14.3%) dei casi analizzati. Tra i disordini polimorfi a cellule B EBV+ sono state riscontrate mutazioni di *TET2* e di *RHOA* in 1/2 (50.0%) casi ciascuno. La proliferazione plasmacellulare analizzata è risultata mutata in *TET2* e *IDH2*. Tra le proliferazioni clonali di blasti B sono state rilevate mutazioni di *TET2*, *DNMT3A* e *IDH2* in 1/2 (50.0%) caso, ciascuna (Tabella 2).

Per quanto riguarda gli 8 casi in cui è stato possibile confrontare le mutazioni in AITL e nei corrispettivi disordini B e/o plasmacellulari, 7/8 (87.5%) casi mostravano mutazioni concordanti con *burden* allelici sostanzialmente sovrapponibili. Tali casi comprendevano 5 DLBCL EBV+, 2 proliferazioni clonali di blasti B e 1 proliferazione plasmacellulare (Tabella 3).

Tabella III: Caratteristiche molecolari delle coppie di AITL e B-LPD			
Caso AITL/B-LPD	Proliferazione T (VAF%)	Proliferazione B (VAF%)	
Caso #1 - AITL/DLBCL EBV+	<i>TET2</i> ^{C1271w}	16.9%	13.4%
	<i>TET2</i> ^{K1299E}	6.3%	6.9%
Caso #2 - AITL/DLBCL EBV+	<i>TET2</i> ^{C1271Y}	14.1%	12.9%
Caso #3 - AITL/DLBCL EBV+	<i>RHOA</i> ^{G17V}	11.7%	6.6%
Caso #4 - AITL/DLBCL EBV+	<i>TET2</i> ^{L694*}	32.0%	40.7%
	<i>TET2</i> ^{Q706*}	27.8%	35.9%
	<i>DNMT3A</i> ^{E117K}	28.2%	-
Caso #5 -AITL/DLBCL EBV+	<i>TET2</i> ^{R1712K}	8.4%	-
	<i>TET2</i> ^{Q138*}	-	21.4%
	<i>DNMT3A</i> ^{G298E}	8.7%	-
	<i>DNMT3A</i> ^{W297*}	9.6%	-
Caso #6 - AITL/clonale di blasti B	<i>DNMT3A</i> ^{V636M}	14.0%	24.2%
	<i>IDH2</i> ^{R172K}	6.2%	5.8%
	<i>RHOA</i> ^{G17V}	7.0%	-
Caso #7 AITL/clonale di blasti B	<i>TET2</i> ^{P874Qfs*26}	31.1%	31.6%
	<i>TET2</i> ^{Y1661*}	34.8%	36.4%
	<i>TET2</i> ^{L1721W}	50.1%	50.1%
Caso #8 AITL/neoplasia plasmacellulare	<i>TET2</i> ^{S835*}	3.9%	11.8%
	<i>IDH2</i> ^{R140G}	14.7%	13.7%

5. DISCUSSIONE

Il presente studio ha considerato una casistica retrospettiva di linfomi a cellule T periferiche con fenotipo TFH, associati a disordini linfoproliferativi B/plasmacellulari, per chiarirne le caratteristiche istopatologiche e (ove disponibili) molecolari.

A tal fine sono stati raccolti 32 casi, provenienti da 5 centri di riferimento italiani per la diagnostica e la terapia delle neoplasie ematologiche (IRCSS Policlinico Sant'Orsola di Bologna; Policlinico Universitario di Milano; Ospedale San Bortolo di Vicenza; Spedali Civili di Brescia; Azienda Ospedale Università di Padova). Di ciascun caso sono state rivalutate le caratteristiche morfologiche e immunofenotipiche, per identificare la tipologia dei processi linfoproliferativi B/plasmacellulari in corso di AITL, anche definendone la relazione temporale e topografica con i cloni neoplastici TFH.

In linea con i dati di letteratura (9), la nostra casistica comprendeva pazienti di età prevalentemente anziana (età mediana alla diagnosi: 73.0 anni), con lieve prevalenza del sesso maschile. La maggior parte dei casi presentava sintomi sistemici e stadio avanzato alla diagnosi. Limitatamente ai casi per i quali fosse disponibile *follow-up*, il decorso clinico si è dimostrato aggressivo con elevati tassi di mortalità correlata a malattia (60.0% dei casi).

Le caratteristiche istologiche dei linfomi a cellule TFH associati a B-LPD ricapitolavano quanto solitamente osservato nei convenzionali AITL e nei linfomi ad essi correlati. Nella maggior parte dei casi, la popolazione neoplastica costituiva una minoranza dell'infiltrato linfoide ed era rappresentata da linfociti di piccola/media taglia con citoplasma chiaro e variabile espressione di PD1, Bcl6, CD10, ICOS e CXCL13. Una ricca componente infiammatoria era presente in tutti i casi e comprendeva istiociti (anche organizzati in granulomi), granulociti neutrofili ed eosinofili, plasmacellule e quote variabili di blasti B di grande taglia per lo più EBV-positivi. Reti di FDC e vasi iperplastici erano presenti nella maggior parte dei casi (14).

La valutazione istologica dei B-LPD associati a linfomi TFH ha documentato *pattern* ricorrenti di malattia, che potevano essere ricondotti a quattro

principali categorie diagnostiche: (i) DLBCL convenzionali (EBV-positivi o EBV-negativi); (ii) disordini linfoproliferativi polimorfi a cellule B, EBV-positivi; (iii) espansioni clonali di blasti B (EBV-positivi o EBV-negativi); e (iv) discrasie plasmacellulari con caratteristiche del tipo plasmocitoma extra-osseo.

La classificazione di tali disordini linfoproliferativi si è basata sulla valutazione del *pattern* di crescita e delle caratteristiche citologiche dell'infiltrato linfoide. I DLBCL erano caratterizzati da ampi aggregati confluenti di blasti di grande taglia a *pattern* di crescita diffuso, mentre i B-LPD polimorfi risultavano composti da elementi EBV-positivi in varia fase maturativa (*i.e.* piccoli linfociti, blasti di grande taglia e plasmacellule mature) con completo sovvertimento dell'architettura tissutale. Da questi si distinguevano espansioni clonali di blasti B, che (pur composte solamente da elementi di grande taglia) costituivano aggregati nodulari uni/multi-focali, nettamente circoscritti rispetto al tessuto adiacente. Tali proliferazioni rappresentano con ogni probabilità forme incipienti di DLBCL, documentate prima che la proliferazione neoplastica acquisisca un *pattern* di crescita diffuso/destruente. Le proliferazioni plasmacellulari erano, invece, composte da aggregati di plasmacellule di piccola/media taglia con minime atipie citologiche e senza significative quote di plasmoblasti. Un singolo caso, infine, era difficilmente inquadrabile in una delle precedenti categorie, essendo caratterizzato da una proliferazione *marginal zone-like* EBV-negativa a spiccata differenziazione plasmacellulare.

I *pattern* istologici qui riportati corrispondono a lesioni già descritte nel contesto di AITL e di varie patologie disimmuni (1,53,72). In particolare, i DLBCL della nostra serie sono riconducibili a linfomi B di alto grado descritti da Attygalle *et al* come forme di progressione di AITL (72). In linea con tale pubblicazione, i nostri casi risultavano spesso (ma non invariabilmente) EBV-positivi e potevano presentarsi sincroni o metacroni al corrispondente linfoma T. A tale fenomeno possono ricondursi anche le espansioni clonali B della nostra serie.

I B-LPD polimorfi costituiscono uno spettro di lesioni nettamente distinto dai DLBCL. Essi, infatti, erano invariabilmente infettati da EBV (EBER) e si presentavano nel 50.0% dei casi spazialmente e temporalmente separati dai corrispettivi AITL. Tali proliferazioni, mai descritte come entità a sé stanti

nell'AITL, possono essere ricondotte ai B-LPD polimorfi correlati a immunodeficienza, di cui alle Classificazioni WHO e ICC 2022 (1,69).

Le neoplasie plasmacellulari in corso di AITL o di altri linfomi TFH costituiscono, infine, un fenomeno raro, precedentemente riportato in alcuni *case reports* e *case series* (53,54). Tali proliferazioni sono costantemente sincrone al linfoma TFH e in stretta vicinanza a questo. In accordo con i dati di letteratura (53,54), la maggior parte di queste è, inoltre, EBV-negativa (Tabella 2).

In sintesi, il presente studio costituisce un tentativo di sistematizzare le caratteristiche istologiche dei B-LPD in corso di AITL, integrando *pattern* almeno parzialmente noti, per identificarne possibili correlati biologici.

Da quanto descritto, si potrebbe infatti assumere che i B-LPD associati a linfomi TFH costituiscono uno spettro ampio ed eterogeneo di proliferazioni B/plasmacellulari, riconducibili a diversi meccanismi patogenetici. I B-LPD polimorfi potrebbero rappresentare, in particolare, espansioni B EBV-correlate secondarie alla disimmunità, che tipicamente si associa ai linfomi TFH. Ciò giustificherebbe, altresì, la frequente presentazione metacrona di tali B-LPD e la loro invariabile positività per EBV.

I DLBCL e le espansioni di blasti B potrebbero, invece, derivare da una varietà di meccanismi patogenetici, tra cui: (i) la trasformazione a linfoma B di alto grado dei blasti di grande taglia EBV-positivi, che tipicamente caratterizzano gli AITL; (ii) l'evoluzione monomorfa di B-LPD polimorfi EBV-positivi; (iii) l'insorgenza *de novo* di linfomi B aggressivi, nel contesto di immunodeficienze secondarie all'AITL o a chemioterapia. Tale varietà di meccanismi patogenetici è supportata dai risultati della nostra casistica. I DLBCL/cloni di blasti B in corso di AITL, hanno, infatti dimostrato notevole variabilità in termini di positività per EBV e di relazione temporale con il corrispettivo linfoma TFH.

Alcuni casi di DLBCL a presentazione metacrona avevano uno stato di EBV discorde rispetto a quello dei blasti B presenti nel linfoma T. Ciò suggerisce l'indipendenza di tali DLBCL dai corrispettivi AITL. In altri pazienti, invece, i DLBCL erano presenti nel medesimo linfonodo dell'AITL e avevano citologia e stato di EBV sovrapponibili a quello dei blasti B nelle aree TFH. Questi casi rappresentano con ogni probabilità evoluzioni clonali dei blasti B degli AITL.

Più complessa è l'interpretazione biologica dei cloni plasmacellulari in stretta associazione spaziale e temporale con i linfomi TFH (53,54). La frequente negatività per EBV di tali neoplasie e la loro citologia per lo più matura potrebbero maggiormente suggerire espansioni clonali in contesti immunologicamente permissivi, ma ulteriori studi sono necessari per chiarire la patogenesi di tali lesioni.

Al fine di valutare le basi genetiche dei B-LPD in corso di linfoma a cellule TFH, il presente studio ne ha infine analizzato il profilo mutazionale, concentrandosi su geni tipicamente mutati nell'AITL (*i.e.* *RHOA*, *TET2*, *DNMT3A* e *IDH2*). Tali analisi sono state condotte su 12/32 (37.5%) casi, in quanto la qualità del DNA dei rimanenti campioni era insufficiente per studi NGS.

Le analisi molecolari hanno documentato frequenti mutazioni di *TET2* in tutte le tipologie di B-LPD, con *burden* allelico molto variabile. Più rare, invece, sono risultate le mutazioni di *DNMT3A* e *IDH2*, con *burden* allelico generalmente medio-basso. In 2 casi è stata infine documentata la mutazione *RHOA*^{G17V}, a basso *burden* allelico, il che suggerisce la presenza di minime quote TFH neoplastiche anche in aree apparentemente costituite solamente da cloni B.

Il profilo mutazionale di *TET2*, *DNMT3A* e *IDH2* nei B-LPD associati a AITL non è di univoca interpretazione e può suggerire: (i) la presenza di tali mutazioni nei cloni B proliferanti; (ii) la presenza di cellule infiammatorie (*e.g.* granulociti, monociti) mutate in tali geni, quali componenti di CHIP; (iii) la presenza di tali mutazioni in linfociti TFH istologicamente non documentati. Per quanto ognuna di tali ipotesi sia valida, il confronto dei profili mutazionali tra coppie di AITL e B-LPD (Tabella 3) suggerisce quale spiegazione più probabile la presenza di cellule infiammatorie con mutazioni CHIP-correlate.

Il *pattern* mutazionale degli AITL e dei B-LPD identifica, infatti, medesime mutazioni con *burden* allelici quasi perfettamente corrispondenti. Ciò esclude che tali mutazioni siano prevalentemente riconducibili ai linfociti B (rari nel contesto di AITL) o ai linfociti TFH (rari, se non virtualmente assenti, nella maggior parte dei B-LPD). È tuttavia possibile che esse coesistano in multipli tipi cellulari (*e.g.* elementi mieloidi, linfociti B e T), derivati da una medesima cellula staminale emopoietica mutata nei geni in oggetto. Ulteriori studi con metodiche di ibridazione *in situ* mutazione-specifica contribuiranno a chiarire il profilo mutazionale dei singoli tipi cellulari presenti nell'AITL e nei B-LPD ad esso correlati.

6. CONCLUSIONI

I B-LPD associati a linfomi TFH costituiscono un eterogeneo gruppo di lesioni linfoproliferative, riconducibili a quattro principali categorie diagnostiche: (i) DLBCL (EBV-positivi o EBV-negativi); (ii) B-LPD polimorfi EBV-positivi; (iii) espansioni clonali di blasti B (EBV-positivi o EBV-negativi); e (iv) proliferazioni plasmacellulari, solitamente EBV-negative.

Lo stato di EBV, il rapporto temporale e la distribuzione anatomica di AITL e B-LPD suggeriscono diversi meccanismi patogenetici per le proliferazioni B, in prima ipotesi riconducibili a: (i) abnormi reazioni disimmuni; o (ii) espansione dei blasti B che popolano gli AITL.

La caratterizzazione molecolare dei B-LPD in AITL documenta frequenti mutazioni in geni CHIP-correlati, che potrebbero essere presenti tanto in linfociti neoplastici quanto in elementi infiammatori di accompagnamento. Ulteriori studi mutazionali *in situ* contribuiranno a chiarire le caratteristiche biologiche dei B-LPD insorti in AITL.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jul;36(7):1720–48.
2. Siaghani PJ, Wong JT, Chan J, Weisenburger DD, Song JY. Epidemiology and Pathology of T- and NK-Cell Lymphomas. In: Querfeld C, Zain J, Rosen ST, editors. *T-Cell and NK-Cell Lymphomas: From Biology to Novel Therapies*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 1–29.
3. Fukumoto K, Nguyen TB, Chiba S, Sakata-Yanagimoto M. Review of the biologic and clinical significance of genetic mutations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2018;109(3):490–6.
4. Chiba S, Sakata-Yanagimoto M. Advances in understanding of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leukemia*. 2020;34(10):2592–606.
5. Thandra KC, Barsouk A, Saginala K, Padala SA, Barsouk A, Rawla P. Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Med Sci*. 2021 Mar;9(1):5.
6. Chen JJ, Tokumori FC, Del Guzzo C, Kim J, Ruan J. Update on T-Cell Lymphoma Epidemiology. *Curr Hematol Malig Rep*. 2024; 3(19): 93-103.
7. Fischer T, Idrobo H, Pavlovsky A, Castro D, Beltran B, Enriquez DJ, et al. Epidemiology, Clinical Features and Outcomes of Peripheral T-Cell Lymphoma in Latin America. *Blood*. 2023 Nov 28;142(Supplement 1):186.
8. Yoon SE, Song Y, Kim SJ, Yoon DH, Chen TY, Koh Y, et al. Comprehensive analysis of peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma in Asian patients: A multinational, multicenter, prospective registry study in Asia. *Lancet Reg Health - West Pac*. 2021 May 1;10:100126.
9. Advani RH, Skrypets T, Civallero M, Spinner MA, Manni M, Kim WS, et al. Outcomes and prognostic factors in angioimmunoblastic T-cell lymphoma: final report from the international T-cell Project. *Blood*. 2021 Jul 22;138(3):213–20.
10. Lachenal F, Berger F, Ghesquières H, Biron P, Hot A, Callet-Bauchu E, et al. Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma: Clinical and Laboratory Features at Diagnosis in 77 Patients. *Medicine (Baltimore)*. 2007 Sep;86(5):282.
11. Cho YU, Chi HS, Park CJ, Jang S, Seo EJ, Huh J. Distinct Features of Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma With Bone Marrow Involvement. *Am J Clin Pathol*. 2009 May 1;131(5):640–6.
12. Ortonne N, Dupuis J, Plonquet A, Martin N, Copie-Bergman C, Bagot M, et al. Characterization of CXCL13+ Neoplastic T Cells in Cutaneous Lesions of

- Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma (AITL). *Am J Surg Pathol*. 2007 Jul;31(7):1068.
13. Lunning MA, Vose JM. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: the many-faced lymphoma. *Blood*. 2017 Mar 2;129(9):1095–102.
 14. Xie Y, Jaffe ES. How I Diagnose Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2021 Jun 12;156(1):1–14.
 15. Lemonnier F, Mak TW. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: more than a disease of T follicular helper cells. *J Pathol*. 2017 Aug;242(4):387–90.
 16. Ree HJ, Kadin ME, Kikuchi M, Ko YH, Go JH, Suzumiya J, Kim DS. Angioimmunoblastic lymphoma (AILD-type T-cell lymphoma) with hyperplastic germinal centers. *Am J Surg Pathol*. 1998 Jun;22(6):643-55
 17. Willenbrock K, Renné C, Gaulard P, Hansmann ML. In angioimmunoblastic T-cell lymphoma, neoplastic T cells may be a minor cell population. A molecular single-cell and immunohistochemical study. *Virchows Arch*. 2005 Jan 1;446(1):15–20.
 18. Quintanilla-Martinez L, Fend F, Moguel LR, Spilove L, Beaty MW, Kingma DW, Raffeld M, Jaffe ES. Peripheral T-cell lymphoma with Reed-Sternberg-like cells of B-cell phenotype and genotype associated with Epstein-Barr virus infection. *Am J Surg Pathol*. 1999 Oct;23(10):1233-40.
 19. Attygalle A, Al-Jehani R, Diss TC, Munson P, Liu H, Du MQ, et al. Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood*. 2002 Jan 15;99(2):627–33.
 20. Attygalle AD, Kyriakou C, Dupuis J, Grogg KL, Diss TC, Wotherspoon AC, Chuang SS, Cabeçadas J, Isaacson PG, Du MQ, Gaulard P, Dogan A. Histologic evolution of angioimmunoblastic T-cell lymphoma in consecutive biopsies: clinical correlation and insights into natural history and disease progression. *Am J Surg Pathol*. 2007 Jul;31(7):1077-88.
 21. Oishi N, Sartori-Valinotti JC, Bennani NN, Wada DA, He R, Cappel MA, et al. Cutaneous lesions of angioimmunoblastic T-cell lymphoma: Clinical, pathological, and immunophenotypic features. *J Cutan Pathol*. 2019;46(9):637–44.
 22. Gerlach MM, Juskevicius D, Vela V, Dirnhofer S, Tzankov A. Bone Marrow Infiltration of Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma: Identification and Prognostic Impact of Histologic Patterns and Diagnostic Application of Ancillary Phenotypic and Molecular Analyses. *Arch Pathol Lab Med*. 2019 Sep 26;144(5):602–11.
 23. De Leval L, Rickman DS, Thielen C, Reynies AD, Huang YL, Delsol G, et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood*. 2007 Jun 1;109(11):4952–63.

24. Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2005 Nov;5(11):853–65.
25. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2375–90.
26. Zettl A, Lee SS, Rüdiger T, Starostik P, Marino M, Kirchner T, et al. Epstein-Barr Virus–Associated B-Cell Lymphoproliferative Disorders in Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma and Peripheral T-Cell Lymphoma, Unspecified. *Am J Clin Pathol*. 2002 Mar 1;117(3):368–79.
27. Dobay MP, Lemonnier F, Missiaglia E, Bastard C, Vallois D, Jais JP, et al. Integrative clinicopathological and molecular analyses of angioimmunoblastic T-cell lymphoma and other nodal lymphomas of follicular helper T-cell origin. *Haematologica*. 2017 Apr;102(4):e148–51.
28. Sakata-Yanagimoto M. Multistep tumorigenesis in peripheral T cell lymphoma. *Int J Hematol*. 2015 Nov 1;102(5):523–7.
29. Pizzi M, Margolskee E, Inghirami G. Pathogenesis of Peripheral T Cell Lymphoma. *Annu Rev Pathol*. 2018 Jan 24;13:293–320.
30. Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, et al. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet*. 2014 Feb;46(2):171–5.
31. Zhang S, Konstantinidis DG, Yang JQ, Mizukawa B, Kalim K, Lang RA, et al. Gene Targeting RhoA Reveals Its Essential Role in Coordinating Mitochondrial Function and Thymocyte Development. *J Immunol*. 2014 Dec 15;193(12):5973–82.
32. Yoo HY, Sung MK, Lee SH, Kim S, Lee H, Park S, et al. A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet*. 2014 Apr;46(4):371–5.
33. Fujisawa M, Sakata-Yanagimoto M, Nishizawa S, Komori D, Gershon P, Kiryu M, et al. Activation of RHOA–VAV1 signaling in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leukemia*. 2018 Mar;32(3):694–702.
34. Rasmussen KD, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev*. 2016 Apr 1;30(7):733–50.
35. Schwartz FH, Cai Q, Fellmann E, Hartmann S, Mäyränpää MI, Karjalainen-Lindsberg ML, et al. TET2 mutations in B cells of patients affected by angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *J Pathol*. 2017;242(2):129–33.
36. Yang L, Rau R, Goodell MA. DNMT3A in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2015 Mar;15(3):152–65.
37. Russler-Germain DA, Spencer DH, Young MA, Lamprecht TL, Miller CA, Fulton R, et al. The R882H DNMT3A Mutation Associated with AML

- Dominantly Inhibits WT DNMT3A by Blocking its Ability to Form Active Tetramers. *Cancer Cell*. 2014 Apr 14;25(4):442–54.
38. Scourzic L, Couronné L, Pedersen MT, Della Valle V, Diop M, Mylonas E, et al. DNMT3A(R882H) mutant and Tet2 inactivation cooperate in the deregulation of DNA methylation control to induce lymphoid malignancies in mice. *Leukemia*. 2016 Jun;30(6):1388–98.
 39. Cairns RA, Iqbal J, Lemonnier F, Kucuk C, de Leval L, Jais JP, et al. IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2012 Feb 23;119(8):1901–3.
 40. Lemonnier F, Cairns RA, Inoue S, Li WY, Dupuy A, Broutin S, et al. The IDH2 R172K mutation associated with angioimmunoblastic T-cell lymphoma produces 2HG in T cells and impacts lymphoid development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Dec 27;113(52):15084–9.
 41. Wang C, McKeithan TW, Gong Q, Zhang W, Bouska A, Rosenwald A, et al. IDH2R172 mutations define a unique subgroup of patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2015 Oct 8;126(15):1741–52.
 42. Cheminant M, Bruneau J, Kosmider O, Lefrere F, Delarue R, Gaulard P, et al. Efficacy of 5-Azacytidine in a TET2 mutated angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2015;168(6):913–6.
 43. Nishizawa S, Sakata-Yanagimoto M, Hattori K, Muto H, Nguyen T, Izutsu K, et al. BCL6 locus is hypermethylated in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Int J Hematol*. 2017 Apr 1;105(4):465–9.
 44. Yao W, Wu F, Zhang W, Chuang S, Thompson JS, Chen Z, et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma contains multiple clonal T-cell populations derived from a common TET2 mutant progenitor cell. *J Pathol*. 2020 Mar;250(3):346–57.
 45. Rohr J, Guo S, Huo J, Bouska A, Lachel C, Li Y, et al. Recurrent activating mutations of CD28 in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia*. 2016 May;30(5):1062–70.
 46. Vallois D, Dobay MPD, Morin RD, Lemonnier F, Missiaglia E, Juilland M, et al. Activating mutations in genes related to TCR signaling in angioimmunoblastic and other follicular helper T-cell-derived lymphomas. *Blood*. 2016 Sep 15;128(11):1490–502.
 47. Palomero T, Couronné L, Khiabani H, Kim MY, Ambesi-Impiombato A, Perez-Garcia A, et al. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet*. 2014 Feb;46(2):166–70.
 48. Lemonnier F, Couronné L, Parrens M, Jaïs JP, Travert M, Lamant L, et al. Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters. *Blood*. 2012 Aug 16;120(7):1466–9.

49. Nguyen TB, Sakata-Yanagimoto M, Asabe Y, Matsubara D, Kano J, Yoshida K, et al. Identification of cell-type-specific mutations in nodal T-cell lymphomas. *Blood Cancer J*. 2017 Jan;7(1):e516.
50. Mhaidly R, Krug A, Gaulard P, Lemonnier F, Ricci JE, Verhoeyen E. New preclinical models for angioimmunoblastic T-cell lymphoma: filling the GAP. *Oncogenesis*. 2020 Aug 14;9(8):1–16.
51. Lewis NE, Petrova-Drus K, Huet S, Epstein-Peterson ZD, Gao Q, Sigler AE, et al. Clonal hematopoiesis in angioimmunoblastic T-cell lymphoma with divergent evolution to myeloid neoplasms. *Blood Adv*. 2020 May 22;4(10):2261–71.
52. Attygalle AD, Cabeçadas J, Gaulard P, Jaffe ES, de Jong D, Ko YH, et al. Peripheral T-cell and NK-cell lymphomas and their mimics; taking a step forward - report on the lymphoma workshop of the XVIth meeting of the European Association for Haematopathology and the Society for Hematopathology. *Histopathology*. 2014 Jan;64(2):171–99.
53. Huppmann AR, Rouillet MR, Raffeld M, Jaffe ES. Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma Partially Obscured by an Epstein-Barr Virus–Negative Clonal Plasma Cell Proliferation. *J Clin Oncol*. 2013 Jan 10;31(2):e28–30.
54. Balagué O, Martínez A, Colomo L, Roselló E, Garcia A, Martínez-Bernal M, et al. Epstein-Barr Virus Negative Clonal Plasma Cell Proliferations and Lymphomas in Peripheral T-cell Lymphomas: A Phenomenon With Distinctive Clinicopathologic Features. *Am J Surg Pathol*. 2007 Sep;31(9):1310.
55. Venkataraman G, Berkowitz J, Morris JC, Janik JE, Raffeld MA, Pittaluga S. Adult T-cell leukemia/lymphoma with EBV-positive Hodgkin-like cells. *Hum Pathol*. 2011 Jul;42(7):1042–6.
56. Nicolae A, Pittaluga S, Venkataraman G, Vijnovich-Baron A, Xi L, Raffeld M, et al. Peripheral T-cell Lymphomas of Follicular T-Helper Cell Derivation With Hodgkin/Reed-Sternberg Cells of B-cell Lineage: Both EBV-positive and EBV-negative Variants Exist. *Am J Surg Pathol*. 2013 Jun;37(6):816.
57. Zaki MAA, Wada N, Kohara M, Ikeda J, Hori Y, Fujita S, et al. Presence of B-cell clones in T-cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2011;86(5):412–9.
58. International T-Cell Lymphoma Project. International Peripheral T-Cell and Natural Killer/T-Cell Lymphoma Study: Pathology Findings and Clinical Outcomes. *J Clin Oncol*. 2008 Sep;26(25):4124–30.
59. Steinhilber J, Mederake M, Bonzheim I, Serinsöz-Linke E, Müller I, Fallier-Becker P, et al. The pathological features of angioimmunoblastic T-cell lymphomas with *IDH2R172* mutations. *Mod Pathol*. 2019 Aug 1;32(8):1123–34.
60. Ham JS, Park HY, Ryu KJ, Ko YH, Kim WS, Kim SJ. Elevated serum interleukin-10 level and M2 macrophage infiltration are associated with poor survival in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2017 Jul 17;8(44):76231–40.

61. Xu M, Wang F, Chen H, Liu L, Liu W, Yang Y, et al. Inactivation of FOXO1 induces T follicular cell polarization and involves angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Cancer Biol Med*. 2019 Nov;16(4):743–55.
62. Moskowitz AJ. Practical Treatment Approach for Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma. *J Oncol Pract*. 2019 Mar;15(3):137–43.
63. Schmitz N, Trümper L, Ziepert M, Nickelsen M, Ho AD, Metzner B, et al. Treatment and prognosis of mature T-cell and NK-cell lymphoma: an analysis of patients with T-cell lymphoma treated in studies of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood*. 2010 Nov 4;116(18):3418–25.
64. Nguyen TB, Sakata-Yanagimoto M, Fujisawa M, Nuhath ST, Miyoshi H, Nannya Y, et al. Dasatinib Is an Effective Treatment for Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma. *Cancer Res*. 2020 May 4;80(9):1875–84.
65. Bennani NN, Kim HJ, Pederson LD, Atherton PJ, Micallef IN, Thanarajasingam G, et al. Nivolumab in patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma: modest activity and cases of hyperprogression. *J Immunother Cancer*. 2022 Jun 23;10(6):e004984.
66. Delfau-Larue MH, Leval L de, Joly B, Plonquet A, Challine D, Parrens M, et al. Targeting intratumoral B cells with rituximab in addition to CHOP in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. A clinicobiological study of the GELA. *Haematologica*. 2012 Oct 1;97(10):1594–602.
67. Bejar R, Lord A, Stevenson K, Bar-Natan M, Pérez-Ladaga A, Zaneveld J, et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 2014 Oct 23;124(17):2705–12.
68. Lemonnier F, Dupuis J, Sujobert P, Tournillhac O, Cheminant M, Sarkozy C, et al. Treatment with 5-azacytidine induces a sustained response in patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2018 Nov 22;132(21):2305–9.
69. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, Quintanilla-Martinez L, Swerdlow SH, Anderson KC, et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood*. 2022 Sep 15;140(11):1229–53.
70. Sondka Z, Dhir NB, Carvalho-Silva D, Jupe S, Madhumita, McLaren K, et al. COSMIC: a curated database of somatic variants and clinical data for cancer. *Nucleic Acids Res*. 2024 Jan 5;52(D1):D1210–7.
71. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. 2019 Jun 1;35(11):1978–80.
72. Attygalle AD, Kyriakou C, Dupuis J, Grogg KL, Diss TC, Wotherspoon AC, et al. Histologic Evolution of Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma in Consecutive Biopsies: Clinical Correlation and Insights Into Natural History and Disease Progression. *Am J Surg Pathol*. 2007 Jul;31(7):1077.