

Linfomi non Hodgkin altamente aggressivi: double- e triple-hit lymphomas

La classificazione WHO 2008 ha identificato una categoria di linfomi non Hodgkin aggressivi, definiti linfomi non classificabili con caratteristiche intermedie tra il linfoma B diffuso a grandi cellule e il linfoma di Burkitt (da qui in poi BL-INT). In molti di questi linfomi (fino all'80% in alcune casistiche) è stato identificato il riarrangiamento di *MYC* insieme a quello di *BCL2* e/o *BCL6*, condizione che è stata definita come "linfomi double-hit" (DH) o "triple-hit" (TH) a seconda del numero di lesioni patogeneticamente rilevanti identificate. Non tutti i BL-INT sono "double-hit" e, viceversa, esistono linfomi "double-hit" con caratteristiche istopatologiche tipiche del linfoma B diffuso a grandi cellule e addirittura casi "double-hit" di linfoma mantellare, linfoma linfoblastico e linfoma follicolare. L'argomento è oggetto di controversie, che si riflettono anche nell'eterogeneità delle casistiche pubblicate e rendono difficile interpretare i risultati dei (pochi) studi clinici disponibili, come ben illustrato in una recente review (Swerdlow SH, 2014).

Definizione

La definizione stringente di "linfomi DH" si applica ai casi in cui viene identificata geneticamente una traslocazione coinvolgente l'oncogene *MYC* (locus 8q24) insieme alla traslocazione t(14;18)(q32;q21) coinvolgente *BCL2*. Esistono rari casi in cui è presente la traslocazione di *MYC* e di *BCL6* in assenza di coinvolgimento di *BCL2* (anch'essi vengono definiti DH) e altrettanto rari casi in cui sono presenti tutte e tre le traslocazioni, condizione che viene definita di "linfomi TH" (Aukema SM, 2011).

In molti lavori riguardanti questa categoria di linfomi non è stata riportata l'evidenza citogenetica delle traslocazioni sopra descritte, ma la sola iperespressione immunoistochimica di *MYC* e/o *BCL2* e/o *BCL6*. Tale espressione non è sempre conseguenza di una traslocazione cromosomica per cui gli ematopatologi più esperti sono oggi concordi nel definire DH o TH solo i casi dimostrati mediante test citogenetico, riservando agli altri la definizione di linfomi "double-esspressor" (DE).

Identificazione genetica dei linfomi DH

La metodica di elezione per l'identificazione dei riarrangiamenti di *MYC*, *BCL2* e *BCL6* è la FISH.

Esistono due tecniche complementari per individuare le traslocazioni di

interesse. Una sonda **break-apart** è formata da due marcatori fluorescenti diretti verso due regioni dello stesso cromosoma a monte e a valle del noto punto di rottura, corrispondente al gene di interesse: pertanto, nella cellula normale non riarrangiata si avrà un segnale di fusione dato dalla sovrapposizione dei due marcatori, mentre nella cellula in cui è avvenuta la rottura e il conseguente riarrangiamento i due marcatori saranno distanziati, dando luogo a due segnali distinti (Figura I).



Figura I – FISH: tecnica “Break apart”

Una sonda **dual fusion** è al contrario formata da due marcatori diretti verso regioni di cromosomi diversi, noti per essere oggetto del riarrangiamento: in questo caso la condizione normale sarà la presenza di due segnali fluorescenti separati e quella patologica la presenza di un segnale unico di fusione (Figura II).



Figura II – FISH: tecnica “Dual fusion”

In uno studio recente, il riarrangiamento di *MYC* è stato evidenziato nel 38% dei casi di DLBCL con sonda break-apart, nel 10% dei casi con sonda dual fusion e nel 51% dei casi impiegando contemporaneamente le due metodiche (Tzankov A, 2014). La diagnosi di linfoma DH o TH richiede quindi l'impiego della FISH per tutti e tre i geni di interesse, il che non sarebbe realizzabile per motivi di tempo e di costo nella totalità dei pazienti con nuova diagnosi di DLBCL. Un approccio ragionevole per identificare la maggior parte dei linfomi DH/TH è quello di analizzare con FISH i soli linfomi che hanno le maggiori probabilità di presentare le traslocazioni, vale a dire tutti i casi di BL-INT e i DLBCL con alta cinetica proliferativa ($Ki-67 > 80\%$) e iperespressione immunoistochimica di *MYC* ($>40\%$) e *BCL2* ($>50\%$) (Green TM, 2012).

Caratteristiche cliniche e prognosi dei linfomi DH

I pazienti con linfoma DH sono generalmente anziani e l'età mediana alla diagnosi si colloca nella 7ª decade di vita (Aukema SM, 2011). La presentazione clinica è in genere aggressiva, con malattia in stadio avanzato, incremento della LDH e frequente ed esteso coinvolgimento extranodale. Dal punto di vista biologico, l'iperespressione isolata di *MYC* determina aumentata proliferazione cellulare ma, al tempo stesso, attiva delle vie di segnalazione proapoptotiche attraverso *BIM/BAX* che bilanciano e mitigano l'effetto proliferativo. In presenza di alterazioni genetiche di *BCL2* e *BCL6*, che inattivano le normali vie proapoptotiche della cellula, l'iperespressione di *MYC* comporta una spinta proliferativa ben più incontrollata: ciò spiega perché i linfomi DH presentino maggiore aggressività biologica e scarsa risposta ai trattamenti convenzionali (Johnson NA, 2012). La maggior parte dei lavori concorda nel riconoscere che i pazienti con linfoma DH hanno una sopravvivenza inferiore rispetto agli

altri DLBCL, mentre ci sono risultati ancora controversi sul ruolo prognostico della traslocazione isolata di *MYC* o della sola iperespressione immunoistochimica di *MYC* e/o *BCL2* e/o *BCL6* (linfomi DE). Una recente analisi su un'ampia casistica retrospettiva di 311 pazienti con linfoma DH ha individuato quattro fattori di rischio predittivi della sopravvivenza (stadio Ann Arbor 3-4, leucociti $>10^3/\mu\text{L}$, LDH >3 volte i livelli superiori della norma, presenza di coinvolgimento del sistema nervoso centrale): i pazienti con 0, 1 o >1 fattore di rischio hanno una sopravvivenza a 2 anni rispettivamente del 91%, 59% e 41% (Petrich AM, 2014).

Terapia dei linfomi DH

La maggior parte dei dati disponibili sul trattamento dei linfomi DH si basa su casistiche e osservazioni retrospettive. Uno dei primi lavori (Barrans S, 2010) aveva analizzato una casistica di 303 pazienti con DLBCL trattati con R-CHOP: il 14% dei pazienti presentava riarrangiamento di *MYC* e la maggior parte di essi era definibile come DH. La sopravvivenza a 2 anni risultava significativamente inferiore nei pazienti con riarrangiamento di *MYC*/DH (35%) rispetto ai pazienti con *MYC* non riarrangiato (61%). Analoghi risultati sono stati riportati in altri lavori (Klapper W, 2008; Savage KJ, 2009) mentre un recente studio prospettico di confronto tra R-CHOP-14 e R-CHOP-21 in pazienti con DLBCL di età superiore a 60 anni (Cunningham D, 2013) non ha identificato la condizione DH come parametro sfavorevole anche se si conferma un trend di sopravvivenza inferiore (OS a 2 anni dei pazienti DH 63% vs non-DH 85%, $p=0,06$).

Considerata l'aggressività clinica, la scarsa risposta allo schema R-CHOP e la almeno parziale somiglianza genetica con il linfoma di Burkitt, molti clinici hanno trattato i pazienti con linfomi DH con schemi di terapia intensificati. Ancora una volta, i dati disponibili si riferiscono a casistiche retrospettive con criteri di inclusione non sempre omogenei, tuttavia sembrano emergere alcuni dati interessanti. Un'analisi condotta su 106 pazienti con linfoma DH trattati con vari regimi di chemioterapia ha evidenziato che lo schema DA-EPOCH-R (dose adjusted etoposide, prednisone, vincristina, ciclofosfamide, doxorubicina, rituximab) determina percentuali superiori di remissioni complete rispetto a R-CHOP ($p=0,01$) e ad altri schemi intensificati di chemioterapia quali R-HyperCVAD e R-CODOX-M/IVAC ($p=0,07$), rispetto ai quali è meglio tollerato in particolare nei pazienti in età avanzata (Gamdhi M, 2013). Nell'esperienza del gruppo MD Anderson, comprendente 56 pazienti analizzati retrospettivamente, la probabilità di ottenere una remissione completa con R-CHOP (20%) era significativamente inferiore a quella con DA-EPOCH-R (68%) o R-HyperCVAD (70%); la sopravvivenza libera da eventi dell'intera coorte era di soli 8 mesi e non si osservavano benefici sulla EFS tra i pazienti in RC sottoposti successivamente a trapianto o meno (Oki Y, 2014). Recentemente sono stati riportati i risultati preliminari di uno studio prospettico di trattamento di pazienti con DLBCL o BL-INT con riarrangiamento di *MYC*, trattati con 6 cicli DA-EPOCH-R: ad un follow-up mediano di 14 mesi la PFS è pari al 79% e la OS è del 77%. Circa la metà dei pazienti trattati era DH (gli altri presentavano riarrangiamento isolato di *MYC*): la PFS dei pazienti DH (87%) non è inferiore a quella dei

pazienti non-DH (Dunleavy K, 2014).

Nell'insieme questi dati suggeriscono che pazienti con linfomi aggressivi "double hit" debbano essere trattati con schemi di chemioterapia intensificati, che un piccolo gruppo che non presenta variabili di rischio alla diagnosi può essere trattato con intento curativo nella quasi totalità dei casi e che sono necessari ulteriori studi per definire il ruolo di strategie trapiantologiche e dei nuovi farmaci in questo tipo di linfomi.

BIBLIOGRAFIA

- Aukema SM, Siebert R, Schuuring E, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood* 2011;117:2319-2331.
- Barrans S, Crouch S, Smith A, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol* 2010;28:3360-3365.
- Cunningham D, Hawkes EA, Jack A, et al. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet* 2013;381:1817-1826.
- Dunleavy K, Fanale M, LaCasce A, et al. Preliminary report of a multicenter prospective phase II study of DA-EPOCH-R in MYC-rearranged aggressive B-cell lymphoma. *Blood (ASH annual meeting abstracts)* 2014;124:abs#395.
- Gamdhi M, Petrich A, Cassaday R, et al. Impact of induction regimen and consolidative stem cell transplantation in patients with double hit lymphomas (DHL): a large, multicenter retrospective analysis. *Blood (ASH annual meeting abstracts)* 2013;122:abs#640.
- Green TM, Nielsen O, de Stricker K, et al. High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2012;36:612-619.
- Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 2012;30:3452-3459.
- Klapper W, Stoecklein H, Zeynalova S, et al. Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-cell lymphomas treated within randomised trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Leukemia* 2008;22:2226-2229.
- Oki Y, Noorani M, Lin P, et al. Double hit lymphoma: the MD Anderson Cancer Center clinical experience. *Br J Haematol* 2014;166:891-901.
- Petrich AM, Gandhi M, Jovanovic B, et al. Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in double-hit lymphoma: a multicenter retrospective analysis. *Blood* 2014;124:2354-2361.
- Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* 2009;114:3533-3537.
- Swerdlow SH. Diagnosis of "double-hit" diffuse large B-cell lymphoma and

B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus ICH. *Hematology Am Soc Hematol Edu Program* 2014;2014:90-99.

- Tzankov A, Xu-Monette ZY, Gerhard M, et al. Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol* 2014; 27:958-971.