



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN
Oncologia, Ematologia e Patologia

Ciclo XXXVII

Settore Concorsuale: 06/D3

Settore Scientifico Disciplinare: MEDS-09/B

Indice prognostico clinico-molecolare nei linfomi diffusi a grandi cellule B

Presentata da:

Costantino Riemma

Coordinatore Dottorato

Prof.ssa Manuela Ferracin

Supervisore

Prof.sa Elena Zamagni

Co-supervisore

Gerardo Musuraca

INDICE

Introduzione	pag. 3
Predire l'outcome nei pazienti con DLBCL	pag. 4
Myc, Bcl-2 e Bcl-6	pag. 8
Sulla genetica del DLBCL: nuove intuizioni e nuova classificazione	pag. 8
Radiomica	pag. 10
MIXED-MOLECULAR CLINICAL INDEX (MMCI)	pag. 12
MATERIALI E METODI	pag. 14
RISULTATI	pag. 17
CONCLUSIONI	pag. 22
BIBLIOGRAFIA	pag. 25

INTRODUZIONE

I linfomi diffusi a grandi cellule B (*Diffuse Large B-Cell Lymphoma*, DLBCL) rappresentano circa il **25-50% dei linfomi non- Hodgkin**, configurandosi come il sottotipo più frequente di questi tumori.

L'incidenza dei DLBCL è stimata in circa **7.2 casi per 100.000 persone all'anno** a livello mondiale, con una prevalenza maggiore nei paesi occidentali.

La malattia è particolarmente comune negli adulti più anziani, con un'età media alla diagnosi di circa **65 anni**, più comuni negli uomini rispetto alle donne, con un rapporto maschio- femmina di circa **1,3:1**; anche se i motivi di questa differenza non sono del tutto chiari, si ipotizza che fattori genetici, ormonali e ambientali possano contribuire a questo squilibrio [1].

Il trattamento standard di prima linea per i DLBCL è rappresentato dal regime **R-CHOP** somministrato ogni 21 giorni i cui farmaci sono:

- rituximab (mAb anti-CD20): 375mg/mq, g1;
- ciclofosfamide: 750mg/mq, g1;
- doxorubicina: 50mg/mq, g1;
- vincristina: 1.4mg/mq, g1;
- prednisone, 100mg, g1-5.

Questo schema terapeutico è (stato) adottato come trattamento standard per i DLBCL grazie alla sua efficacia e tollerabilità dimostrata in studi clinici ed ha stabilito una risposta duratura in una percentuale significativa di pazienti: circa l'80% dei pazienti trattati con R-CHOP ottiene una risposta completa [2] con una PFS a 5 anni stimata del 60%. [3]

Nonostante i buoni tassi di risposta, una quota significativa di pazienti mostra una resistenza primaria al trattamento o una recidiva precoce (≤ 6 mesi), in particolare nei pazienti con fattori di rischio molecolari sfavorevoli come le alterazioni nei geni MYC, Bcl-2 Bcl-6, Tp53

La sopravvivenza globale (OS) mediana nei pazienti refrattari o recidivanti può scendere a 6-12 mesi. [4]

Per i pazienti con età fino a 70 anni circa e con performance status fino a 2, il trattamento di

seconda linea più comune era, fino a poco tempo fa, la chemioterapia ad alte dosi seguita da trapianto autologo di cellule staminali (ASCT) di consolidamento. Tuttavia, non tutti i pazienti sono eleggibili per ASCT, e il tasso di recidiva post-trapianto comunque, rimaneva significativo, in quanto l'ottenimento di una risposta completa duratura era vicina al 25-30%. [5]

Negli ultimi anni, sono stati sviluppati quindi approcci terapeutici innovativi, come le terapie CAR-T (terapia con cellule T modificate per esprimere il recettore chimerico per l'antigene) e nuove tipologie di anticorpi monoclonali, tra cui, gli anticorpi bispecifici (BiTE con doppio "link" al tumore e alle cellule T bypassando la specificità del T cell receptor), gli anticorpi "*drug conjugate*", in cui al target di superficie si è aggiunto un "veleno cellulare" veicolato con precisione sulla cellula tumorale stessa, ed anticorpi ingegnerizzati per essere più affini sia nella parte Fc che nella parte del target tumorale della Ig. Tutte queste nuove terapie mirano a superare la resistenza biologica intrinseca del tumore o quella che si è evoluta durante il corso delle varie chemioterapie ed utilizzano l'immunoterapia come "core" nel meccanismo d'azione. Tuttavia la chemioimmunoterapia di prima linea, rimane il punto chiave su cui si gioca la maggior parte delle percentuali di guarigione dei pazienti con DLBCL e particolare importanza riveste quindi la possibilità di capire anticipatamente quali meccanismi "nascosti" di resistenza/recidiva possano rendere questi pazienti ad alto rischio di ulteriori trattamenti di salvataggio.

Predire l'*outcome* nei pazienti con DLBCL

È possibile predire la risposta alla prima linea di terapia per i pazienti affetti dal DLBCL?

Vi sono fattori che ne influenzano la recidiva?

Vi sono metodiche in grado di individuare all'esordio i pazienti con malattia refrattaria?

Nel 1993 l'*International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project* elaborò un indice prognostico [6] al fine di identificare i pazienti affetti da DLBCL ad elevato rischio di refrattarietà o progressione precoce, basandosi su **caratteristiche cliniche** del paziente (performance status, età) e le **caratteristiche della malattia** (stadio Ann-Arbor, LDH) (*Tabella 1*).

L'IPI (*international prognostic index*) da allora è diventata parte della pratica routinaria durante la stadiazione dei pazienti all'esordio di malattia: è facilmente calcolabile e validato in ampie coorti retrospettive di pazienti (*Tabella 2*).

Fattori di rischio

Età > 60 anni	+ 1
Stadio Ann-Arbor III-IV	+ 1
ECOG PS $\geq$ 2	+ 1
LDH > ULN	+ 1

Tabella 1.

IPI score

Punteggio	Gruppo di rischio	4-yrs OS (%)	4-yrs PFS (%)
0-1	Low	82	85
2	Low-intermediate	81	80
3	High-intermediate	49	51
4-5	High	59	51

Tabella 2.

Con il progredire delle tecniche di sequenziamento genico, agli inizi del XXI secolo, è stato scoperto che l'espressione di determinati geni da parte delle cellule patologiche è correlata alla risposta alla terapia e alla durata della risposta.

Il profilo di espressione genica (GEP), eseguito su materiale biotico congelato, individuava due sottogruppi di *cellula di origine* (COO) del linfoma diffuso a grandi cellule B:

- **Activated B-Cell like (ABC)**
- **Germinal Center B-Cell like (GC)**

Le due categorie differivano profondamente sia in termini di rischio di recidiva (PFS) che di sopravvivenza globale (OS) (*figura 1*) [7].

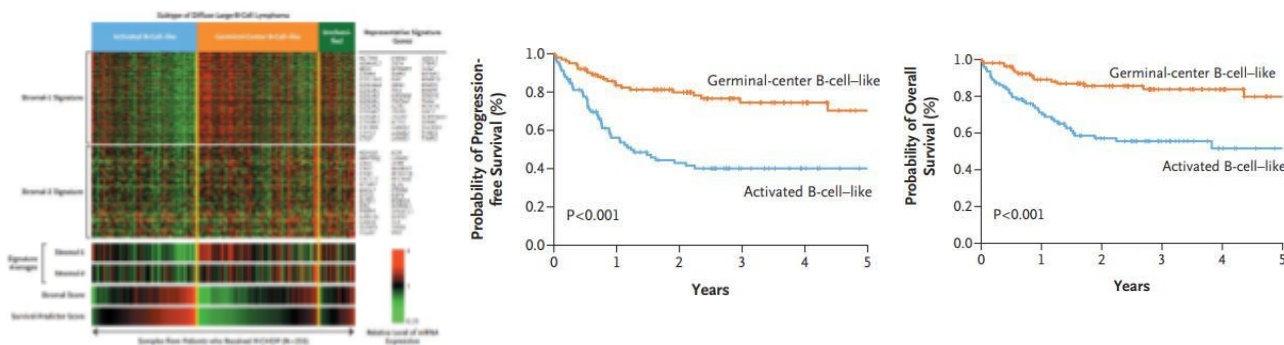


Figura 1. [7]

Ai fattori clinici e alle caratteristiche di presentazione della malattia per la predizione dell'*outcome* si aggiungeva, dunque, anche la **firma genetica** delle cellule di DLBCL.

La GEP, tuttavia, non si poteva eseguire in routine né vi era la disponibilità del test per la maggior parte delle istituzioni, a causa della necessità di personale altamente qualificato,

in secondo luogo per i costi della metodica e la necessità di standardizzazione della stessa. Nel corso degli anni sono stati proposti quindi numerosi algoritmi per ovviare a tale problematica. Tutti si basano sull'espressione istopatologica di determinati marcatori al fine di individuare la COO [8].

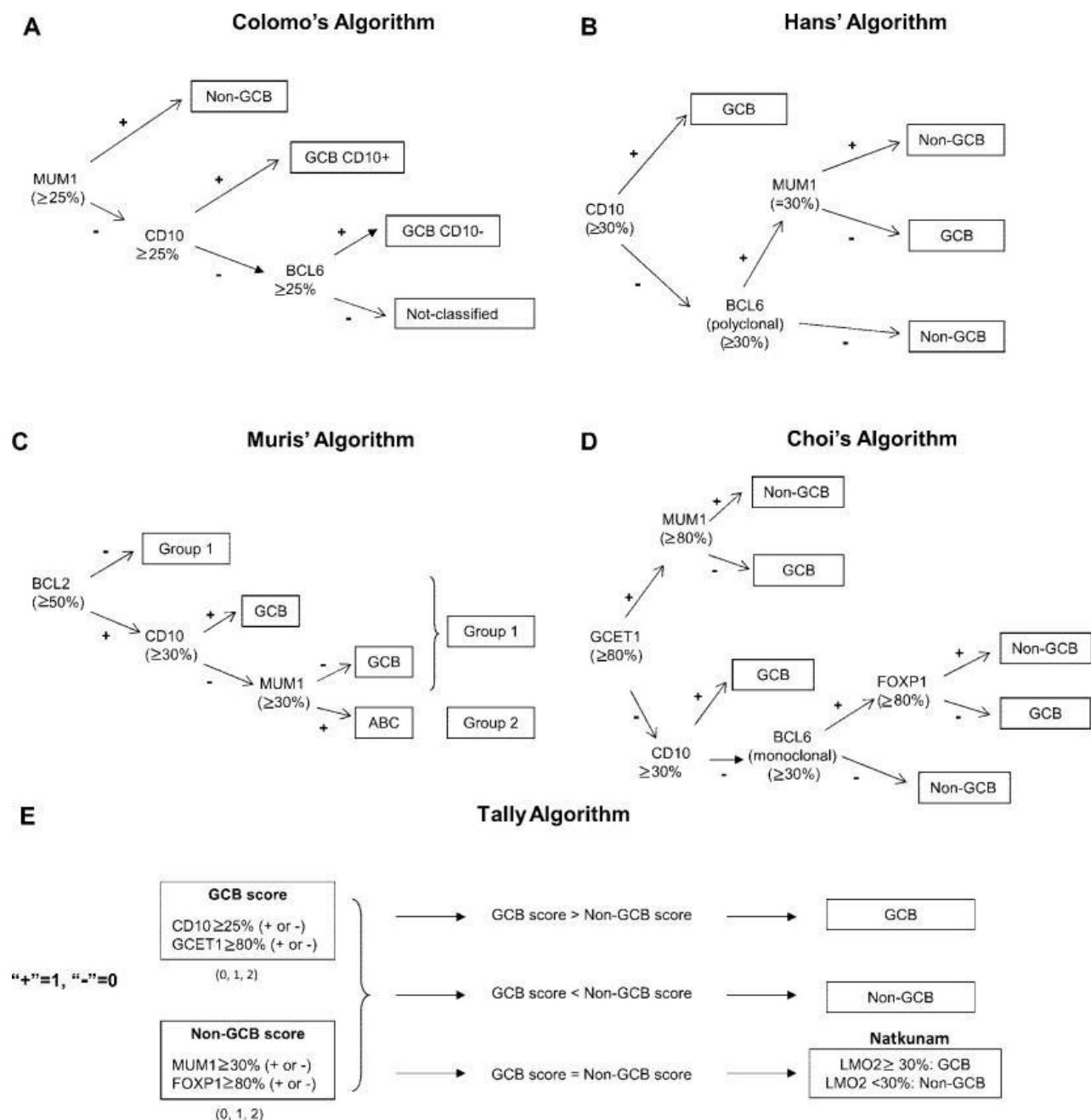


Figura 2. Algoritmi istopatologici per la individuazione della COO [8].

Il più comunemente usato in pratica clinica è noto come *algoritmo di Hans* [9], che valuta l'espressione dei marcatori CD10, Bcl-6 e MUM1 per l'individuazione del sottotipo di DLBCL all'esordio di malattia (figura 3).

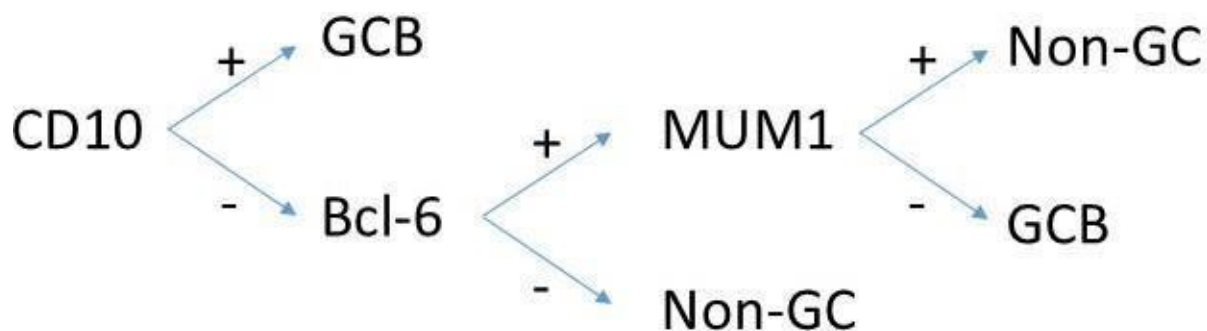


Figura 3. Algoritmo di Hans

L'uso di questi algoritmi come surrogato della GEP, seppure di facile uso e di disponibilità in qualsiasi laboratorio di immunoistochimica, non ha dimostrato una concordanza significativa con la tecnica di *profiling* genetico [8].

Nel 2014 infatti, l'espressione genica delle cellule patologiche è stata valutata su piattaforma Nanostring con la validazione di un set di 20 geni (Lymph2Cx) su tessuto fissato in formalina e paraffina (FFPET) per distinguere con precisione i sottotipi COO (GC, ABC e non classificati). [10]

La tecnologia NanoString ha dimostrato elevatissima affidabilità, e i risultati del Lymph2Cx mantengono la capacità prognostica di differenziare i gruppi COO, con il sottotipo ABC associato a una prognosi peggiore, rispetto al sottotipo GC, in linea con i modelli basati su tessuto congelato [11]. Il test Lymph2Cx, con una tempistica di esecuzione inferiore a 36 ore, risulta facilmente implementabile nella pratica clinica, aprendo lo scenario a terapie personalizzate per i pazienti con DLBCL.

MYC, Bcl-2 e Bcl-6

Discorso a parte merita l'iperespressione e/o il riarrangiamento di Myc, in particolare con Bcl-2/Bcl-6 (*double-triple-hit lymphoma*)

La sola presenza del riarrangiamento del gene Myc (in genere con il promotore delle catene pesanti delle Ig) rappresenta un fattore prognostico sfavorevole, indipendentemente dall'IPI [12].

Se il gene Myc, invece, risulta riarrangiato con il gene Bcl-2 (o Bcl-6), si configura un cosiddetto *double-hit lymphoma* (DH) ed in questo caso la prognosi è risultata essere nettamente sfavorevole [13], acquisendo caratteristiche di aggressività biologica e

resistenza, tali da rendere la normale chemioterapia con R-CHOP inefficace per questa tipologia di pazienti. La presentazione clinica all'esordio, spesso drammatica per l'aggressività della malattia, necessita attualmente di trattamenti di tipo intensivo.

La concomitante iperespressione di Myc e Bcl-2, condizione definita come *double-expressor lymphoma* (DE), in particolare con valori concomitanti di Myc $\geq 40\%$ e di Bcl-2 $\geq 50\%$, è anch'essa associata ad una prognosi sfavorevole [14] ma fino ad oggi non si è trovata una concordanza scientifica dei dati, sulla necessità o possibilità di trattamenti alternativi rispetto allo standard of care con R-CHOP. Alcune recenti pubblicazioni dimostrano un beneficio di risposta nelle analisi post Hoc, dall'utilizzo di un anticorpo "drug conjugated" (Polatuzumab) in questa tipologia di linfomi e tuttavia tali dati necessitano di ulteriori conferme.

Sulla genetica del DLBCL: nuove intuizioni e nuova classificazione

Ancor più di recente, studi più approfonditi con tecniche di sequenziamento esomico (WES) hanno svelato nuove caratteristiche genetiche, oltre la COO, nonché la firma mutazionale del DLBCL, contribuendo ad individuare almeno cinque cluster di malattia con comportamento diverso (risposta alla terapia, PFS), indipendentemente dall'IPI e della COO[15].

Al di là delle implicazioni sulla patogenesi della malattia, i cluster di DLBCL così individuati potrebbero avere soprattutto un risvolto clinico infatti, il recente studio randomizzato di fase II GUIDANCE-01 che, nel braccio sperimentale, ha aggiunto alla terapia standard Ibrutinib (cluster MCD e BN2-like), Lenalidomide (cluster N1-like e NOS), Tucidinostat (cluster EZB-like) e Decitabina (cluster TP53mut), in base al cluster identificato con WES, ha dimostrato che la terapia R-CHOP + X è superiore sia nell'indurre la risposta che nel mantenerla (PFS) [16].

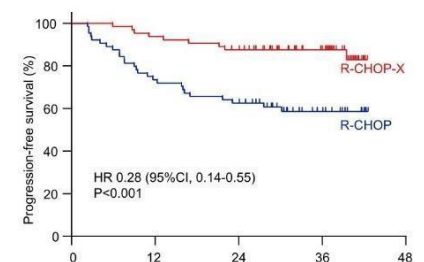
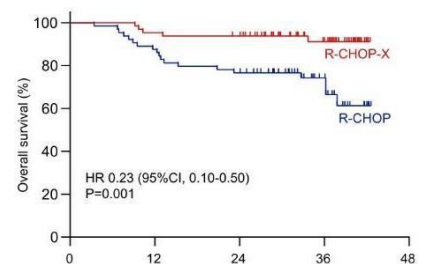
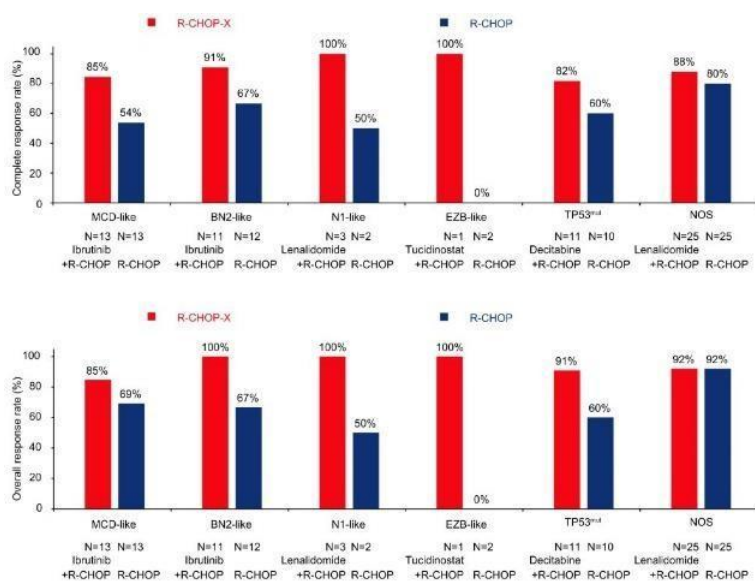


Figura 4. Risposte, PFS, OS dello studio GUDANCE-01

Radiomica

La radiomica è una tecnica che si basa sulla estrazione ed analisi di caratteristiche quantitative dagli esami di *imaging*, come la PET e la TAC.

Questi dati, noti come *caratteristiche radiomiche*, includono misure relative a forma, intensità, trama e altre proprietà delle immagini del tumore.

L'obiettivo della radiomica è quello di individuare pattern che possono fornire informazioni prognostiche o predittive, come il rischio di recidiva, la risposta alla terapia da correlare poi ovviamente alla sopravvivenza del paziente, supportando così la personalizzazione dei trattamenti oncologici.

Studi recenti infatti evidenziano l'utilità della radiomica PET/TAC all'esordio per la prognosi dei pazienti con DLBCL nel predire la risposta alla terapia e il rischio di recidiva.

Parametri come il *volume tumorale metabolico* (MTV) e la *massima distanza di*

disseminazione tumorale (Dmax) sono fortemente associati al rischio di progressione e alla sopravvivenza e mostrano una correlazione significativa con la prognosi, spesso superando l'efficacia predittiva dell'*Indice Prognostico Internazionale* (IPI), nell'identificare pazienti a prognosi più sfavorevole [17].

La radiomica PET può anche identificare *biomarcatori predittivi* di sopravvivenza libera da progressione (PFS) e sopravvivenza globale (OR) e potrebbe essere utile nei pazienti con maggiore eterogeneità genetica del tumore ed in cui la risposta terapeutica può essere complessa.

Metodi avanzati di analisi radiomica usano algoritmi di apprendimento automatico (*deep learning*) per estrarre caratteristiche quantitative complesse dalle immagini radiologiche mediche, come quelle di PET e TAC.

A differenza della radiomica tradizionale, che si basa su caratteristiche predefinite (come la forma, la trama e l'intensità dei pixel), il *deep features radiomic* sfrutta reti neurali per individuare automaticamente pattern più complessi e nascosti nelle immagini grezze (*raw data*) non visibile all'occhio umano.

Studi recenti hanno dimostrato che questi parametri (*deep-features radiomic*) migliorano la predizione del rischio di recidiva in confronto ai criteri convenzionali, e potrebbero aiutare a delineare piani terapeutici su misura e ad individuare pazienti a rischio di refrattarietà o recidiva [18].

MIXED-MOLECULAR CLINICAL INDEX (MMCI)

Come abbiamo visto la risposta alla prima linea della terapia in pazienti con DLBCL è discreta, tuttavia circa un 40% dei pazienti recidivano entro 5 anni: la maggior parte avviene entro i primi due anni dal termine delle cure.

Una frazione non piccola (10-15%) invece mostra una malattia refrattaria già alla prima linea di terapia, intesa come resistenza alla terapia o ricaduta entro i sei mesi dal termine delle cure: questi pazienti avevano un'aspettativa di vita che si aggirava intorno ai 12 mesi. L'avvento di terapie di nuova generazione, in particolare le CAR-T, gli anticorpi bi-specifici (BiTE) come il glofitamab o l'epcoritamab, gli anticorpi farmaco-coniugati (polatuzumab, loncastuximab) o i nuovi anticorpi monoclonali (tafasitamab), in uso singolo o in combinazione, hanno permesso di offrire nuove opportunità di trattamento soprattutto in questa categoria di pazienti ad alto rischio.

Tuttavia non siamo ancora in grado di identificare, alla diagnosi, i pazienti a rischio di recidiva o quelli refrattari con algoritmi prognostici disponibili nella pratica clinica e che siano di semplice utilità.

A tal fine, abbiamo ideato uno studio con l'obiettivo di valutare le caratteristiche cliniche, radiologiche, radiomiche e genetiche, attraverso una serie di pannelli predefiniti e facilmente ripetibili per poi integrare i dati ottenuti con l'intelligenza artificiale al fine di sviluppare un indice prognostico molecolare-clinico misto (mixed- molecular clinical-index, MMCI) di semplice maneggevole uso nella pratica clinica.

Obiettivo primario dello studio

- Identificare nuovi biomarcatori prognostici per i pazienti con DLBCL in termini di sopravvivenza libera da progressione (PFS) e in grado di aggiungere capacità predittiva ai fattori clinici importanti riconosciuti per i pazienti con DLBCL in termini di sopravvivenza libera da progressione (PFS).

Obiettivi secondari dello studio

- Identificare *nuovi biomarcatori* associati alla sopravvivenza globale (OS) e al tasso di risposta obiettiva (ORR).

- Caratterizzare il microambiente immunitario dei tessuti emopoietici dei pazienti con DLBCL attraverso la *trascrittomica*.
- Valutare la correlazione tra l'espressione dei geni dei *checkpoint* immunitari e l'espressione dell'mRNA.
- Descrivere lo stato mutazionale di un pannello di geni rilevanti per la patogenesi del DLBCL.
- Valutare la correlazione tra espressione proteica, stato mutazionale e firma dell'mRNA.
- Convertire i dati di imaging (PET) in descrittori quantitativi delle caratteristiche biologiche del linfoma per predire la sopravvivenza dei pazienti.

Centri partecipanti

- IRST “D. Amadori” IRCCS (U.O. di Patologia dell’Ospedale «Morgagni» di Forlì e dell’Ospedale «Bufalini» di Cesena
- Rimini (Ospedale «Infermi»)
- S. Orsola IRCCS (Bologna)
- Ravenna (Ospedale «S. Maria delle croci»)

MATERIALI E METODI

I campioni conservati in paraffina-formalina (FFPE) sono stati raccolti da ciascuna Unità di Patologia a cui afferisce la Struttura partecipante.

Otto sezioni di tessuto tumorale (FFPE) di 10 micron e due sezioni di 5 micron sono state collezionate assieme ad un vetrino con colorazione ematossilina-eosina.

I vetrini sono conservati presso il Laboratorio di Bioscienze dell'IRST, a temperatura ambiente.

Un kit specifico è stato usato per estrarre RNA dai campioni di tessuto tumorale e il profilo di espressione genica è stato studiato tramite il Lymph2Cx (versione IUO e PanCancer IO 360) su piattaforma Nanostring. Lo stato mutazionale dei geni di rilevanza per la patogenesi del DLBCL è stato valutato tramite kit Lymphoma Solution (SOPHIA Genetics) con Illumina MiSeq.

Dopo adeguata discussione coi partners, è in corso l'emendamento dello studio affinché sia possibile arruolare pazienti già trattati e con esito (analisi retrospettiva).

L'acquisizione, l'integrazione e la correlazione dei dati radiologici (PET e TAC) con quelli biologici sarà eseguita direttamente l'I.R.S.T. con software di SOPHIA Genetics: saranno acquisite i dati grezzi delle PET, alla diagnosi e al termine della terapia: questi saranno analizzati e comparati ai dati biologici e molecolari attraverso l'intelligenza artificiale, con l'obiettivo di identificare e definire una correlazione tra caratteristiche biologiche e dati radiologici.

Si specifica che tutti i dati sensibili dei pazienti retrospettivi saranno tutelati da un processo di anonimizzazione ed in accordo con la legislazione vigente.

RISULTATI

In totale, 44 campioni sono stati valutati per l'estrazione di RNA per Pancancer IO 360.

Su 44 pazienti, tuttavia, sono disponibili al momento le CRF di 19 pazienti (sede IRST – Meldola), per cui saranno riportati i risultati solo per questi 19 pazienti.

Il profilo di espressione genica è stato analizzato con PanCancer IO 360 e Lymph2Cx: per tutti è stata eseguita la ricerca della Cellula-di-Origine (COO).

Dei 19 campioni per cui è possibile eseguire l'analisi completa: 12 sono risultati utili per l'analisi PanCancer IO 360, in 7 il materiale non è stato sufficiente per l'estrazione di RNA.

Su tutti i campioni è stata ricercata la COO tramite Nanostring Lymph2Cx.

Per quanto valutabile (e con i limiti dell'esiguità del campione) le analisi di sopravvivenza sono state eseguite e riportate (vedi sotto).

Lo studio include quindi 19 pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), di cui 6 pazienti femmine (31,6%) e 13 maschi (68,4%).

L'età mediana alla diagnosi è di 71 anni, con un intervallo tra 51 e 80 anni.

Il 26,3% dei pazienti ha livelli elevati di LDH.

Per quanto riguarda i siti extranodali coinvolti, 18 pazienti (94,7%) presentavano più di un sito extranodale all'esordio.

Tre pazienti (16,7%) erano in stadio Ann-Arbor III, mentre la maggioranza era in stadio avanzato.

L'IPI superiore a 3 è stato osservato nel 36,8% dei casi, e 4 (21%) pazienti mostravano un coinvolgimento del sistema nervoso centrale (SNC) all'esordio.

In base alla classificazione della COO valutata con Lymph2Cx su piattaforma Nanostring, 11 pazienti (57,9%) mostravano il fenotipo *GCB-like* (*germinal center-like*), 6 pazienti (31,6%) il fenotipo *ABC-like* (*activated B-Cell like*), e 2 pazienti (10,5%) non erano classificabili. Le caratteristiche della popolazione in studio sono riportate in Tabella 3.

Tutti i pazienti sono stati trattati con regime CHOP-like (R-CHOP; R-COMP; regimi intensivi ad es. R-DA-EPOCH, etc.)

Le caratteristiche istopatologiche sono, invece, riportate in *Tabella 4*.

Tabella 3.		
Pazienti = 19	N	%
Sesso		
F	6	31.6
M	13	68.4
Età alla diagnosi, mediana [range]	71 [51-80]	
Malattia extranodale	3	15.8
LDH elevato	5	26.3
ECOG		
2	1	5.3
> 3	1	5.3
Siti extranodali coinvolti		
1	1	5.3
> 1	18	94.7
Stadio Ann-Arbor		
III	3	16.7
IV	11	61.1
IPI score > 3	7	36.8
Midollo osseo infiltrato	4	21
SNC coinvolto	4	21
Cell-of-origin (Lymph2Cx)		
GC	11	57.9
ABC	6	31.6
Non classificato	2	10.5

Tabella 4.		
Istopatologia	%	
CD20		
Neg	1	5.3
Pos	18	94.7
CD5		
Neg	10	90.9
Pos	1	9.1
CD10		
Neg	10	62.5
Pos	6	37.5
BCL6		
Neg	3	15.8
Pos	16	84.2
BCL2		
Neg	4	23.5
Pos	13	76.5
MUM1/IRF4		
Neg	7	38.9
Pos	11	61.1
C-Myc		
Neg	3	18.7
Pos	14	81.3
Ki67%		
Mediana [IQ – IIIQ]	80 [55 – 90]	
Min - Max	40 - 90	

In *Tabella 5* invece è riportato l'elenco dei geni testati con pannello PanCancer IO 360: sono evidenziati (in rosso) quelli associati alla PFS con un livello di significatività almeno del 5%. Dato il numero elevato di geni testati (750), in alcuni casi si è reso necessario un aggiustamento del *p-value* per test multipli, in quanto all'aumentare del numero dei test eseguiti, aumenta anche la probabilità di un'associazione falsamente positiva.

Come atteso, aggiustando per i confronti multipli, non risulta significativa alcuna associazione al momento.

Essendo l'analisi in una fase estremamente precoce ed esplorativa e per cui i dati disponibili sono esigui e per questa relazione sono state prese in considerazione i *p-value* non aggiustati per l'analisi di sopravvivenza.

In queste analisi precoce l'espressione di ciascun gene è stata considerata come variabile continua e per poter rappresentare graficamente i risultati tramite curve di Kaplan-Meier, si è provveduto a dicotomizzare i geni sulla base del valore mediano (solo quello con *P-value* non aggiustato <0.01)

Il *p-value* delle curve di Kaplan-Meier si riferisce al test del log-rank per il confronto tra curve. Si specifica che il *p-value* associato al test del log-rank può non dare risultati simili a quelli ottenuti con il modello di Cox in quanto, nel primo caso, la variabile è stata dicotomizzata mentre nel secondo è considerata come variabile continua.

Infine, i risultati di queste associazioni sono fortemente influenzati dalla bassa numerosità dei pazienti e di eventi di recidiva/morte osservati finora.

Tabella 5. Elenco geni (Pancancer IO 360)

GENE	HR	LL	UL	P	p.adj.BY	p.adj.BH
CCL20	4.38079637	1.52373495	12.5949574	0.00611393	1	0.31488588
COL17A1	1.94503651	1.2085404	3.13036043	0.00614197	1	0.31488588
MMP1	1.82203077	1.17389821	2.82801023	0.00747821	1	0.31488588
SERPINB5	1.89104506	1.1821554	3.02502649	0.00785817	1	0.31488588
IL6	3.90541417	1.42921805	10.6717515	0.00790092	1	0.31488588
PDZK1IP1	1.85762714	1.16854076	2.95306649	0.00883088	1	0.31488588
CCL13	3.13454379	1.32250837	7.42934036	0.00946347	1	0.31488588
LAMB3	4.75315575	1.43900448	15.7000829	0.01055896	1	0.31488588
CXCL8	2.35786347	1.21331273	4.5820999	0.01139476	1	0.31488588
IRF8	0.26319767	0.09315186	0.74365673	0.0117741	1	0.31488588
ITGB8	2.52463231	1.22709868	5.19417745	0.01187122	1	0.31488588
IL1B	5.15478852	1.4354021	18.5117778	0.01193454	1	0.31488588
RAD51	0.01717915	0.00071637	0.41197165	0.01217582	1	0.31488588

AREG	3.24959989	1.29069731	8.18154606	0.01236224	1	0.31488588
LILRA5	4.04939529	1.34517726	12.1899192	0.01287058	1	0.31488588
S100A12	4.90528657	1.40026535	17.1837691	0.01290783	1	0.31488588
CD84	0.17055934	0.04229462	0.68780584	0.01291887	1	0.31488588
RORC	2.79458883	1.24230858	6.28646283	0.01297301	1	0.31488588
CDKN1A	9.78445153	1.58707032	60.3221487	0.013984	1	0.31488588
JAK3	0.16283559	0.03821055	0.69392952	0.01412845	1	0.31488588
RELN	4.4372948	1.34785696	14.6080673	0.0142461	1	0.31488588
ITGA1	3.00202545	1.24554737	7.23549905	0.01431864	1	0.31488588
CD19	0.49811133	0.28504058	0.87045464	0.01440043	1	0.31488588
BID	0.29220432	0.10867318	0.78568937	0.01477283	1	0.31488588
ADORA2A	0.18419018	0.04720359	0.71871705	0.01487395	1	0.31488588
FOSL1	31.9083851	1.96394623	518.41798	0.0149135	1	0.31488588
CD79B	0.51282613	0.2989614	0.87968093	0.01528373	1	0.31488588
CXCL2	2.60353367	1.19611237	5.6670157	0.01589926	1	0.31488588
NCR1	2.49648177	1.18504988	5.25920583	0.01610269	1	0.31488588
RELB	0.08099232	0.0104524	0.62758383	0.01613182	1	0.31488588
IFI27	5.41243752	1.35891177	21.5573083	0.01662484	1	0.31488588
IFI6	10.5178937	1.50462087	73.5242274	0.01770425	1	0.31488588
CXCL3	2.43703134	1.16596736	5.09372901	0.01787546	1	0.31488588
ATF3	2.61007044	1.17790642	5.783539	0.01811225	1	0.31488588
ITPK1	6.58343752	1.36815374	31.6789323	0.0187224	1	0.31488588
EZH2	0.16896422	0.03832212	0.74497198	0.01882959	1	0.31488588
CXCL1	3.338292	1.21846193	9.14611546	0.01906753	1	0.31488588
LILRB4	0.3310342	0.13068153	0.83855491	0.01973983	1	0.31488588
HK1	0.16526447	0.03622718	0.75391867	0.02008593	1	0.31488588
MS4A1	0.57386637	0.35773879	0.92056724	0.02126691	1	0.31488588
RPL23	0.00948384	0.00018006	0.49951488	0.02126983	1	0.31488588
ERBB2	2.31175661	1.13278202	4.717782	0.02130541	1	0.31488588
SIGLEC8	0.34004976	0.13493217	0.85697758	0.02218182	1	0.31488588
DUSP1	2.24996531	1.12289403	4.50830068	0.02220538	1	0.31488588
PROM1	2.30832355	1.12621655	4.73120164	0.02233701	1	0.31488588
BMP2	3.36154065	1.1878889	9.51263668	0.02234935	1	0.31488588
CD79A	0.47548238	0.25107776	0.90045209	0.02250072	1	0.31488588
MLH1	0.04651854	0.00330225	0.65530318	0.02301854	1	0.31488588
LCK	0.330172	0.12698545	0.85847281	0.02302793	1	0.31488588
HES1	4.14725773	1.21619384	14.1422742	0.02304543	1	0.31488588
IL1A	1.6222395	1.06720003	2.46594914	0.02355179	1	0.31488588
CD45RA	0.57892652	0.35986593	0.93133551	0.02424573	1	0.31488588
PTPRC	0.36748137	0.15343334	0.88013827	0.02467358	1	0.31488588
CXCL5	2.1308584	1.09994057	4.12800259	0.02494212	1	0.31488588

WNT5A	3.05055438	1.15065061	8.08749587	0.02495786	1	0.31488588
HEY1	3.15727051	1.14917994	8.67432218	0.02577269	1	0.31488588
VHL	0.10787881	0.01523355	0.76396092	0.02577797	1	0.31488588
CXCL6	1.94988818	1.07940337	3.52237546	0.02688348	1	0.31488588
MAP3K7	0.03014359	0.00135236	0.67189134	0.0270325	1	0.31488588
HDC	2.4190254	1.09753796	5.33164601	0.02846772	1	0.31488588
CDKN2B	3.57570012	1.14286688	11.1873322	0.02856562	1	0.31488588
PLA2G2A	1.47767446	1.0402252	2.09908567	0.02924568	1	0.31488588
PIK3R5	2.29133941	1.08661903	4.83171762	0.02939136	1	0.31488588
COL4A5	1.60347605	1.04804106	2.45327739	0.02953814	1	0.31488588
FLNB	4.16806531	1.15228973	15.0767363	0.02955124	1	0.31488588
SOX10	3.47674937	1.13015327	10.6957052	0.02975287	1	0.31488588
CDH1	5.24470172	1.17360667	23.4379174	0.0300422	1	0.31488588
CDK2	0.04959478	0.00326594	0.75311886	0.03044556	1	0.31488588
TLR3	3.93236997	1.13667612	13.6041685	0.03059744	1	0.31488588
TNFRSF11A	2.68237378	1.09616104	6.56393437	0.03069123	1	0.31488588
ITGB2	0.37965339	0.15748328	0.91525079	0.03098893	1	0.31488588
PCK2	4.99688011	1.15747365	21.5718179	0.03108861	1	0.31488588
HDAC11	6.80306087	1.18991776	38.89482	0.03112757	1	0.31488588
RSAD2	2.47859062	1.08322126	5.67142806	0.03161493	1	0.31488588
CLEC14A	4.61983084	1.14057271	18.7123861	0.03201225	1	0.31488588
TGFBR1	14.721021	1.25820627	172.236034	0.03211359	1	0.31488588
MMP9	0.46194554	0.22708581	0.93970505	0.03303897	1	0.31488588
LAMA1	5.49808612	1.14138276	26.4844993	0.03360128	1	0.31488588
P4HA2	1.94278592	1.05190049	3.58818838	0.03387084	1	0.31488588
NF1	17.1485238	1.24069724	237.021456	0.03392843	1	0.31488588
TPM1	2.24215158	1.06284096	4.73000561	0.03400767	1	0.31488588
AXL	5.76070611	1.13483666	29.2427413	0.03463791	1	0.31512137
SIGLEC5	0.28833074	0.09010947	0.9225958	0.03610649	1	0.31512137
DPP4	1.82815103	1.03823925	3.21904243	0.03662122	1	0.31512137
GNLY	1.88214582	1.03841326	3.41142879	0.03714304	1	0.31512137
KLRD1	10.8452666	1.1440721	102.808038	0.0377782	1	0.31512137
PTPN11	0.03058601	0.00113535	0.8239786	0.03797001	1	0.31512137
IL1R2	1.63233576	1.02617075	2.59656595	0.03854166	1	0.31512137
IER3	2.8751469	1.05353154	7.84643782	0.03922971	1	0.31512137
TIGIT	0.29083489	0.08977582	0.94217943	0.03946787	1	0.31512137
CBLC	2.88786578	1.05164174	7.93023751	0.03962279	1	0.31512137
CPA3	1.82547255	1.02897784	3.23850513	0.03962585	1	0.31512137
CASP1	3.80273016	1.0653146	13.5741655	0.03964589	1	0.31512137
NFKB1	0.11316797	0.01418924	0.90258492	0.03971417	1	0.31512137
SPIB	0.667412	0.4538146	0.98154353	0.03991537	1	0.31512137

GMIP	0.1384673	0.02057357	0.93193309	0.04211011	1	0.32898527
WNT4	2.83612937	1.03282413	7.7879956	0.04311139	1	0.33333553
BRD3	14.6927423	1.0761094	200.608486	0.04390853	1	0.33603463
NECTIN2	4.07795395	1.02924767	16.1571495	0.045392	1	0.33839523
PSMB5	14.2992692	1.0483869	195.032099	0.0459984	1	0.33839523
REN	0.38065718	0.14673573	0.98748879	0.04704999	1	0.33839523
DUSP2	0.22443443	0.05134641	0.98099981	0.04709394	1	0.33839523
DLL4	4.66427452	1.01879834	21.3540362	0.04726054	1	0.33839523
PMS2	0.04050531	0.00169603	0.96736508	0.04765209	1	0.33839523
TPSAB1B2	1.74087313	1.00497028	3.01565064	0.04796816	1	0.33839523
PVR	3.4134797	1.00984787	11.5382168	0.04818489	1	0.33839523
CD209	1.79646666	1.00444499	3.21301066	0.04827772	1	0.33839523
ATM	0.16899706	0.02876816	0.99276443	0.04906776	1	0.3407483
F2RL1	2.23200014	1.00061293	4.97877299	0.04982528	1	0.34283452
APOE	0.44040235	0.19361708	1.00174133	0.050487	1	0.34422951

Di seguito sono riportate le immagini (figura da 5 a 11) delle curve di Kaplan-Meier valutate con *log-rank* test per i geni con P-value *non aggiustato* < 0.01.

Il *cut-off* per definire i due gruppi (*low* e *high*) è il *valore mediano dei valori di espressione di ogni singolo gene*.

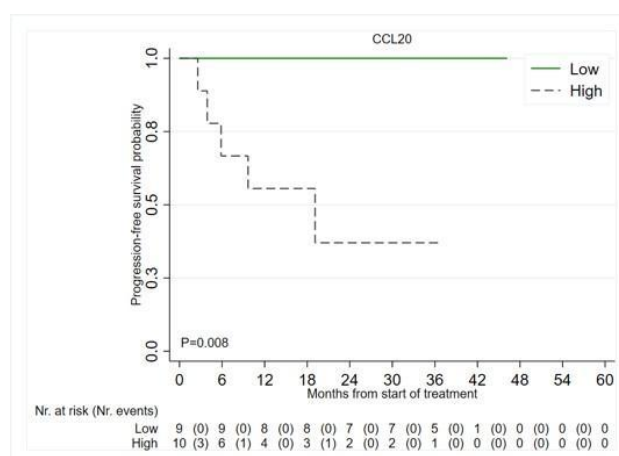


Figura 5. CCL20.

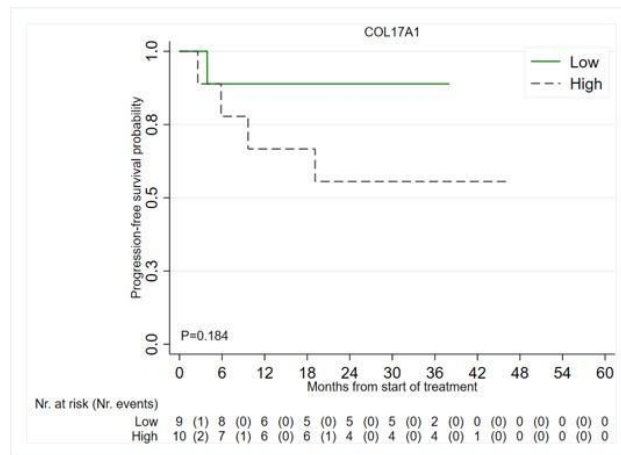


Figura 6. COL17A1

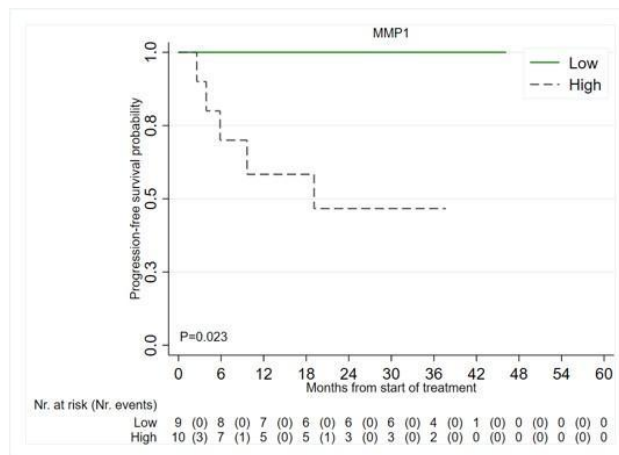


Figura 7. MMP1

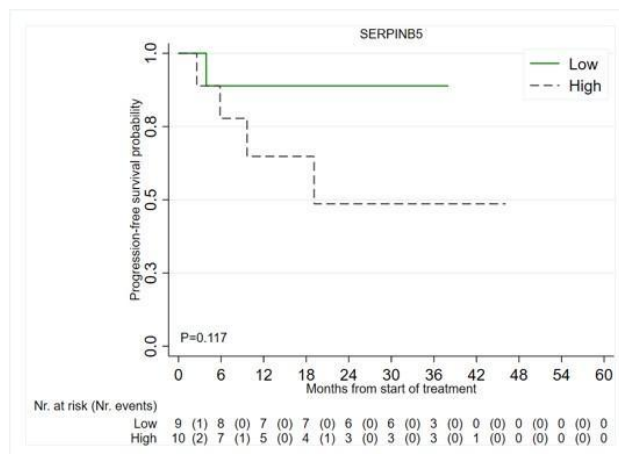


Figura 8. SERPINB5

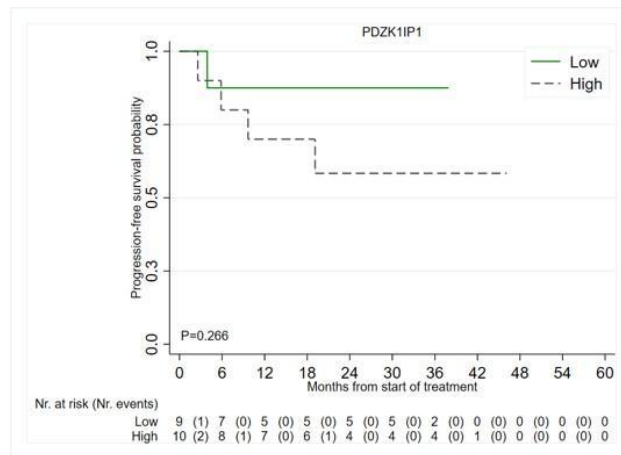


Figura 9. PDZK1P1

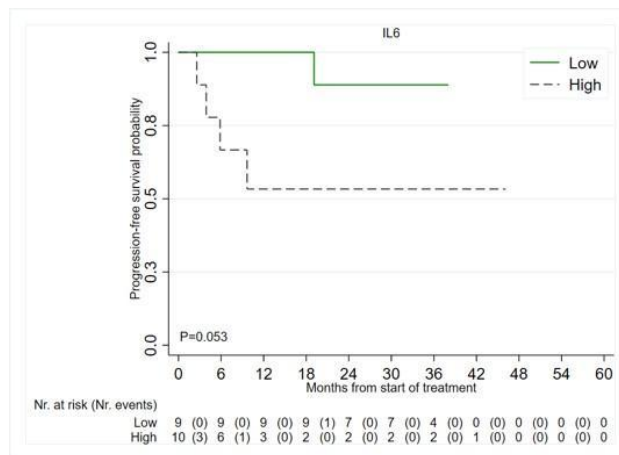


Figura 10. IL6

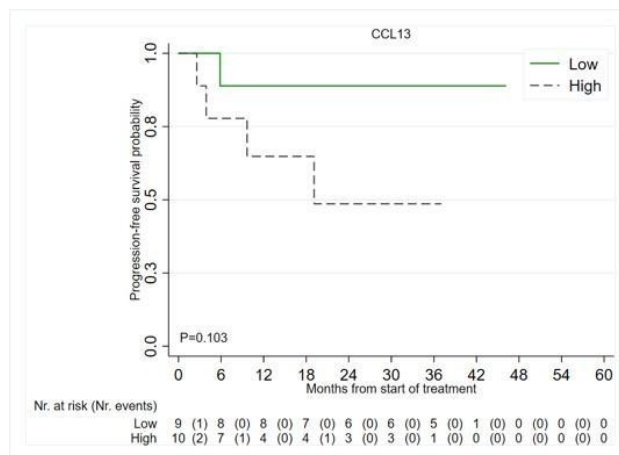


Figura 11. CCL13

CONCLUSIONI

Il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) rappresenta una sfida clinica complessa per via della sua eterogeneità biologica e molecolare.

L'approccio clinico-molecolare integrato ha dimostrato di essere cruciale per migliorare la stratificazione del rischio e la personalizzazione dei trattamenti. In particolare, l'utilizzo di indici prognostici come l'IPI, combinato con la classificazione della cellula di origine (COO) e lo stato mutazionale di geni chiave come MYC, BCL2 e BCL6, consente di identificare pazienti con prognosi sfavorevole che potrebbero beneficiare di terapie mirate.

L'introduzione della tecnologia NanoString e del test Lymph2Cx ha permesso di migliorare la precisione e la fruibilità per la classificazione della COO su campioni FFPET, facilitando l'applicazione clinica e supportando il disegno di terapie personalizzate.

Inoltre, l'approccio radiomico applicato agli esami PET e TAC, con l'analisi quantitativa di caratteristiche dell'imaging, si è rivelato promettente per predire l'outcome e il rischio di recidiva.

La combinazione di analisi genomiche, proteomiche e radiomiche potrebbe portare alla creazione di un indice misto molecolare-clinico (MMCI), che integrerebbe aspetti biologici e clinici per identificare i gruppi a prognosi estremamente sfavorevole all'interno dei sottotipi COO, di facile fruibilità e ripetibilità nella normale pratica clinica.

BIBLIOGRAFIA

1. Morton LM, et al. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*, 2006
2. Coiffier B, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *NEJM*, 2002.
3. Sehn LH, Salles G. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *NEJM*, 2021
4. Crump M. et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood*, 2017.
5. E. Van Den Neste et al. Outcome of patients with relapsed diffuse large B-cell lymphoma who fail second-line salvage regimens in the International CORAL study. *Lancet*, 2016.
6. Shipp M et al. A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *NEJM* 1993.
7. G. Lenz et al. Stromal Gene Signatures in Large-B-Cell Lymphomas. *NEJM*, 2008.
8. G. Gonzalo-Gutiérrez et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*, 2011.
9. C. P. Hans et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B- cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 2024.
10. D.W. Scott et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood*, 2014.
11. D.W. Scott et al. Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsie. *JCO*, 2015.
12. S. Barrans et al. Rearrangement of MYC Is Associated With Poor Prognosis in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated in the Era of Rituximab. *JCO*, 2010.

13. C. Copie-Bergman et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood*, 2015.
14. A. M. Staiger et al. Clinical Impact of the Cell-of-Origin Classification and the MYC/BCL2 Dual Expresser Status in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated Within Prospective Clinical Trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. *JCO*, 2017.
15. B. Chapuy et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nature*, 2018
16. M. Zhang et al. Genetic subtype-guided immunochemotherapy in diffuse large B cell lymphoma: The randomized GUIDANCE-01 trial. *Cancer Cell*, 2023
17. J. J. Eertink et al. Baseline PET radiomics outperforms the IPI risk score for prediction of outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 2023
18. J. Chen et al. Survival prediction in diffuse large B-cell lymphoma patients: multimodal PET/CT deep features radiomic model utilizing automated machine learning. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2024