



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN
PATOLOGIA, ONCOLOGIA E EMATOLOGIA
Ciclo 35

Settore Concorsuale: 06/D3 - MALATTIE DEL SANGUE, ONCOLOGIA E REUMATOLOGIA

Settore Scientifico Disciplinare: MEDS-09/B MALATTIE DEL SANGUE

DISEGNO DI NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI PERSONALIZZATI
PER IL LINFOMA NON HODGKIN B DIFFUSO A GRANDI
CELLULE

Presentata da: Alice Morigi

Coordinatore Dottorato

Prof. Manuela Ferracin

Supervisore

Prof. Pier Luigi Zinzani

Co-Supervisore:

Dott. Alessandro Broccoli

Esame finale anno 2025

1 SOMMARIO

2	Abstract	2
3	Linfoma non hodgkin b diffuso a grandi cellule.....	3
3.1	Epidemiologia, diagnosi e classificazione.....	3
3.1.1	Epidemiologia	3
3.2	Clinica	4
3.3	Diagnosi.....	4
3.4	Classificazione.....	5
3.5	Stadiazione e criteri di risposta	9
3.5.1	Fattori prognostici	10
3.6	Trattamento di prima linea	12
3.6.1	Stadi avanzati	12
3.6.2	Stadi precoci	13
3.6.3	Pazienti fragili	14
3.6.4	Profilassi del sistema nervoso centrale	15
3.6.5	Terapia del paziente con DLBCL ricaduto/refrattario	15
4	Il microbioma intestinale e il ruolo nella patogenesi e nella terapia del cancro	20
4.1	Il microbiota intestinale	20
4.2	Microbiota e neoplasie ematologiche.....	24
5	STUDIO ONCOPASSPORT: Disegno di nuovi approcci terapeutici personalizzati per il Linfoma non Hodgkin B Diffuso a Grandi Cellule	27
5.1.1	Analisi del microbiota intestinale	29
5.1.2	Metodi statistici.....	29
5.2	Risultati	30
5.2.1	Caratteristiche dei pazienti	30
5.2.2	Efficacia	31
5.2.3	Eventi avversi	32
5.2.4	Analisi di sopravvivenza.....	35
5.2.5	Risultati analisi microbiota.....	35
6	Discussione e conclusioni	39
7	Bibliografia	41

2 ABSTRACT

Il linfoma non Hodgkin B diffuso a grandi cellule (*Diffuse Large B cell lymphoma*, DLBCL) è la forma più frequente di linfoma non-Hodgkin, con una sopravvivenza globale del 30-50% a 5 anni. Il 60% dei pazienti ottiene e mantiene una risposta completa dopo la prima linea standard di chemioimmunoterapia: R-CHOP (rituximab, ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone). Tuttavia una parte significativa dei malati, 20-25%, ha una ricaduta di malattia o progressione entro due anni dal termine del trattamento di prima linea. Risulta quindi evidente come siano necessarie strategie innovative volte a migliorare e mantenere la risposta alla prima linea e ad individuare i pazienti a maggior rischio di ricaduta. La comprensione della variabilità di risposta dai pazienti con stessa patologia e sottoposti a stesso trattamento è un punto chiave allo scopo di identificare strategie che possano migliorare e potenziare l'efficacia dei farmaci antitumorali e migliorare capacità prognostica dei pazienti.

Recenti ricerche sul ruolo del microbiota intestinale (*Gut Microbiota*, GM) in ambito tumorale hanno evidenziato come questo possa influenzare il decorso della terapia attraverso meccanismi sia diretti (biotrasformazione del farmaco) che indiretti (modulando il metabolismo dell'ospite e le funzioni immunologiche). Anche se preliminari, i dati indicano un possibile impatto della terapia con R-CHOP sulla struttura mutualistica del GM dell'ospite.

Alla luce di tali evidenze è stato condotto uno studio prospettico, in collaborazione con l'Istituto Tumori IRCSS di Meldola, con l'obiettivo di caratterizzare il microbiota dei pazienti affetti da DLBCL all'esordio e di valutare eventuali correlazioni con le risposte ottenute e le tossicità rilevate

I dati da noi raccolti confermano la presenza di un profilo disbiotico e pro infiammatorio del microbiota nei pazienti affetti da DLBCL all'esordio rispetto al gruppo di controllo. Nei pazienti affetti da DLBCL, al baseline e all'EOT, è stata riscontrata un'abbondanza superiore di Proteobacteria (phylum) e delle famiglie Enterobacteriaceae e Streptococcaceae rispetto ai controlli.

La struttura del microbiota nel DLBCL è influenzata, e influenza a sua volta, la malattia, lo stato di sorveglianza immunitaria del paziente, la risposta alla terapia e gli effetti collaterali. Comprendere questi fattori e il loro impatto sarà fondamentale al fine di sviluppare linee terapeutiche personalizzate. Si rendono tuttavia necessari ulteriori studi per chiarire l'origine e il ruolo della disbiosi intestinale nella DLBCL e per concretizzare la possibilità di intervenire sul microbiota con l'obiettivo di migliorare i tassi di risposta al trattamento e aumentare i tassi di sopravvivenza dei pazienti.

3 LINFOMA NON HODGKIN B DIFFUSO A GRANDI CELLULE

I linfomi B linfocitari a grandi cellule (*large B-cell lymphoma*, LBCL), costituiscono il sottotipo istologico più comune di linfoma non-Hodgkin (NHL) e ne rappresentano circa il 25-30%. Il linfoma non Hodgkin B diffuso a grandi cellule non altrimenti specificato (*diffuse large B-cell lymphoma not otherwise specified*, DLBC NOS) rappresenta la forma più comune di LBCL.

Si tratta, infatti, di una patologia eterogenea dal punto di vista morfologico, genetico e di comportamento biologico. A riconoscimento di questo nella classificazione dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) del 2017 sono ora riconosciute numerose nuove entità clinico-patologiche che sono sufficientemente distinte da essere considerate categorie diagnostiche separate, quali il linfoma a cellule B ad alto grado non altrimenti specificato (HGBCL-NOS) ed il linfoma a cellule B ad alto grado con riarrangiamento dei geni MYC e BCL2 e/o BCL6, definito anche linfoma a doppio (DHL) o triplo hit (THL).

Negli ultimi due decenni, una migliore comprensione dei linfomi a grandi cellule B, in termini di epidemiologia, fattori prognostici ed eterogeneità biologica, ha portato ad un perfezionamento della classificazione della malattia e allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

3.1 EPIDEMIOLOGIA, DIAGNOSI E CLASSIFICAZIONE

3.1.1 Epidemiologia

Il DLBCL è il linfoma più comune e rappresenta circa il 25% di tutti i NHL nel mondo sviluppato¹. In tutta Europa, l'incidenza è di circa 4,92 casi ogni 100.000 persone all'anno². L'incidenza sembra variare in base all'etnia ed è stata notata una possibile aggregazione familiare^{1,3,4}.

Come la maggior parte degli altri linfomi non Hodgkin, esiste una predominanza maschile con circa il 55% dei casi che si verificano negli uomini¹ con un rapporto maschi/femmine di 2,1:1. La malattia può esordire a qualsiasi età, sebbene sia più frequente nell'età adulta e anziana, con un'età media alla presentazione di 64 anni circa e con il 30% dei pazienti che ha più di 75 anni alla diagnosi.

Gli studi epidemiologici evidenziano un'origine multifattoriale del DLBCL; sono stati identificati alcuni fattori di rischio quali virus (HIV, epatite B, epatite C), caratteristiche genetiche, disordini autoimmuni, immunodeficienza, radiazioni ionizzanti e pesticidi.

Sebbene il DLBCL non sia considerato una malattia ereditaria, studi di associazione sull'intero genoma hanno identificato molteplici loci di suscettibilità genetica, che implicano funzioni coinvolte con il sistema immunitario^{5,6}.

Il DLBCL si può presentare come forma *de novo*, cioè senza una pregressa anamnesi di linfoma oppure come risultato di una trasformazione di un linfoma a cellule B a basso grado precedentemente noto o occulto al pazienti. Nel caso, invece, di trasformazione a partire dalla leucemia linfatica cronica si parla di sindrome di Richter.

3.2 CLINICA

La manifestazione clinica più frequente è la comparsa di linfadenomegalie a rapida crescita, che possono interessare sia le stazioni linfonodali superficiali che profonde. Se superiori ai 10 cm o a 1/3 del diametro toracico (se localizzate in mediastino) queste vengono definite masse *bulky*. La crescita di queste lesioni può portare allo sviluppo di sintomi secondari all'occupazione di spazio e alla conseguente compressioni di altri organi come sindrome mediastinica o della vena cava superiore, idro-ureteronefrosi o dolore. Possono essere presenti sintomi linfoma-relati che comprendono febbre, sudorazioni notturne profuse e perdita di peso (perdita significativa di almeno il 10% del peso corporeo in 6 mesi).

In circa il 30% dei casi il linfoma si manifesta in stadio precoce (I-II secondo Ann Arbor) e in circa il 40% dei casi con coinvolgimento extranodale.

3.3 DIAGNOSI

La diagnosi dei linfomi a grandi cellule B, come tutti i linfomi, si basa sull'esecuzione di una biopsia escissionale e sul successivo esame istologico del tessuto tumorale. Una corretta diagnosi e classificazione del linfoma richiede spesso, oltre alle caratteristiche morfologiche, anche indagini di immunoistochimica, citometria a flusso e talora molecolari. Lo svolgimento di tutti questi accertamenti richiede campioni biotici adeguati: il solo campionamento con ago aspirato non è solitamente sufficiente per poter eseguire una valutazione completa e tale tecnica sarebbe da riservare solo in caso di sedi inaccessibili dal punto di vista chirurgico.

Nella valutazione diagnostica lo studio dell'**immunofenotipo** ha un ruolo fondamentale ed è condotto attraverso tecniche di immunoistochimica. La colorazione Ki-67 consente di determinare la frazione proliferativa delle cellule ed è solitamente superiore al 40% e occasionalmente può essere >90%.

Le cellule tumorali nel DLBCL generalmente esprimono marcatori delle cellule B quali CD20, CD22, CD19 e CD79a, così come i fattori di trascrizione PAX5, BOB.1 e OCT2. Al contrario non si osserva espressione dei marcatori classici dei linfociti T quali CD2, CD3, CD5 e CD7. Raramente CD5 è espresso e tale risultato si associa ad una malattia più aggressiva con una prognosi peggiore⁷. Dal 50% al 75% dei DLBCLs esprime immunoglobuline di superficie e citoplasmatiche di tipo M.

I LBCL trasformati da forme di linfoma indolente possono mantenere alcuni dei marcatori fenotipici presenti nella componente di origine. Inoltre, valutando l'espressione della ciclina

D1, è possibile distinguere le forme DLBCL CD5+ dalla variante pleomorfa del linfoma mantellare, anch'esso CD5+. Altri marcatori comunemente espressi sono il CD10 dal 30 al 60% dei casi e MUM1/IRF4 nel 35-65% dei casi. Sebbene MUM1/IRF4 e BCL6 non siano coespressi nelle cellule B normali, la loro coespressione si può riscontrare nel 50% dei DLBCL.

L'espressione di CD10, BCL6, IRF4, LMO2, GCET1 e FOXP1 è variabile e la combinazione di queste molecole permette la costruzione di algoritmi immunoistochimici in grado di identificare i sottotipi definendo la cellula di origine (*cell of origin*, COO) secondo l'algoritmo di Hans: origine dai linfociti B del centro germinativo (GCB) o di origine dalle cellule B attivate (ABC). Tale algoritmo subentra alla GEP (*gene expression profiling*) nella distinzione nei sottotipi, sebbene quest'ultima sia considerata il *gold standard*, ma non sempre è di facile applicazione clinica.

Altri antigeni da valutare per ragioni prognostiche sono il CD30, BCL2 e MYC. L'espressione di CD30 è presente in circa il 25% dei casi (in particolare nella variante anaplastica) ed è associata a una malattia più favorevole^{8,9}. La proteina BCL2 è espressa nel 25-80% dei DLBCL e BCL6 è espressa nel 70% circa (indipendente dal riarrangiamento del gene BCL6)¹⁰⁻¹². L'espressione simultanea delle proteine BCL2 e MYC definisce i cosiddetti linfomi *dual expressor* che sono caratterizzati da prognosi peggiore, indipendentemente dal fatto che appartengano al sottotipo GCB o ABC, anche sono più comunemente ABC¹³.

3.4 CLASSIFICAZIONE

La classificazione aggiornata dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha modificato e ulteriormente categorizzato i linfomi a grandi cellule B, che sono una raccolta eterogenea di

entità clinico-patologiche, di cui il linfoma a grandi cellule B diffuso, non altrimenti specificato (DLBCL, NOS), è il più comune (Figure 1 e 2)¹⁴.

Large B-cell lymphomas

Diffuse large B-cell lymphoma, NOS	(Same)
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma	(Same)
Diffuse large B-cell lymphoma/ high grade B-cell lymphoma with <i>MYC</i> and <i>BCL2</i> rearrangements	High-grade B-cell lymphoma with <i>MYC</i> and <i>BCL2</i> and/or <i>BCL6</i> rearrangements
ALK-positive large B-cell lymphoma	(Same)
Large B-cell lymphoma with <i>IRF4</i> rearrangement	(Same)
High-grade B-cell lymphoma with 11q aberrations	Burkitt-like lymphoma with 11q aberration
Lymphomatoid granulomatosis	(Same)
EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma	EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma, NOS
Diffuse large B-cell lymphoma associated with chronic inflammation	(Same)
Fibrin-associated large B-cell lymphoma	<i>Not previously included</i> (Previously considered a subtype of diffuse large B-cell lymphoma associated with chronic inflammation)
Fluid overload-associated large B-cell lymphoma	<i>Not previously included</i>
Plasmablastic lymphoma	(Same)
Primary large B-cell lymphoma of immune-privileged sites	<i>Not previously included</i> , encompassing primary diffuse large B-cell lymphoma of the CNS in revised 4 th edition (plus primary large B-cell lymphoma of the vitreoretina and primary large B-cell lymphoma of the testis)
Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type	(Same)
Intravascular large B-cell lymphoma	(Same)
Primary mediastinal large B-cell lymphoma	(Same)
Mediastinal grey zone lymphoma	B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classic Hodgkin lymphoma
High-grade B-cell lymphoma, NOS	(Same)

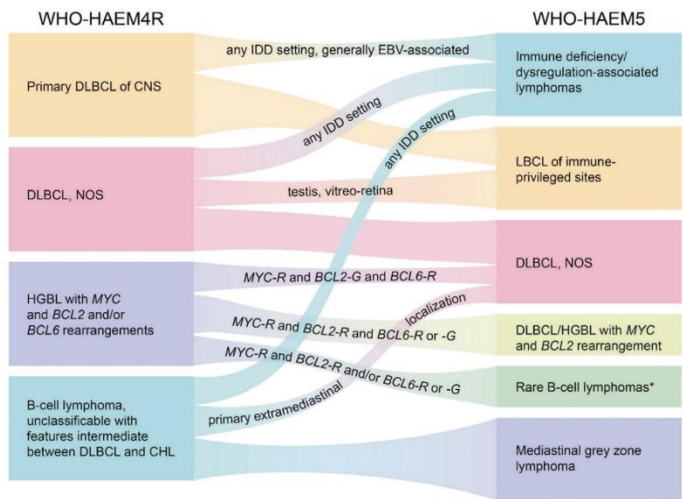


Figure 1 e 2. Confronto e integrazione delle classificazioni WHO (a destra WHO-HAEM5, a sinistra WHO-HAEM4). Alaggio et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms

Le caratteristiche biologiche così eterogenee riflettono le scoperte acquisite negli ultimi 10-20 anni.

Il DLBCL NOS stesso, pur rappresentando un'unica entità, è altamente eterogeneo. Il profiling dell'espressione genica (GEP) ha delineato due sottotipi molecolari distinti di DLBCL: il sottotipo simile a cellula B del centro germinativo (GCB) e il sottotipo simile a cellula B attivata

(ABC). Il sottotipo GCB rappresenta il 40-50% dei casi di linfoma diffuso a grandi cellule B, il sottotipo ABC il 50-60%.

Nel 2000, Alizadeh et al hanno confrontato per la prima volta i profili di espressione genica dei tumori linfoidi con i profili delle cellule linfoidi normali¹⁵. Dal loro studio è emerso come ci fossero almeno due gruppi distinti all'interno del DLBCL. Il primo gruppo, che è stato designato come GCB, era caratterizzato da un'elevata espressione di geni espressi nelle normali cellule B del centro germinativo. Il secondo gruppo ha mostrato un'espressione molto bassa di questi geni delle cellule B del centro germinativo, ma un'elevata espressione di geni normalmente espressi dalle cellule B attivate ed è stato quindi denominato ABC DLBCL. Questi due raggruppamenti hanno spiegato parte dell'eterogeneità clinica nel DLBCL, poiché i pazienti con DLBCL ABC hanno generalmente prognosi peggiore rispetto al DLBCL GCB. Questo lavoro è stato successivamente validato ed esteso ampliato dal *Leukemia Lymphoma Molecular Profiling Project*, applicando la stessa tecnologia di microarray a una coorte più ampia di pazienti¹⁶. In questo caso sono stati identificati tre raggruppamenti: GCB, ABC e un terzo gruppo chiamato *type 3*. Quest'ultimo, se trattato con CHOP, aveva una prognosi simile al DLBCL ABC.

Si ritiene che questi due sottotipi derivino da diversi stadi di differenziazione linfoide delle cellule B (*cell of origin*, COO), con un'espressione genica simile alla loro normale controparte delle cellule B. Sono stati, infatti, identificati profili funzionali distinti e aberrazioni genetiche all'interno dei due sottotipi. Il sottotipo germinale centro B-cell-like presenta la fusione IGH::BCL2 a causa di t(14;18)(q32;q21) e le mutazioni di geni necessari per lo sviluppo del centro germinativo quali EZH2, GNA13, MEF2B, KMT2D, TNFRSF14, B2M e CREBBP¹⁷. Il sottotipo attivato è caratterizzato da un'attivazione cronica del recettore delle cellule B (BCR) e dell'attivazione di NFκB, esprime IRF4/MUM1¹⁸. Sono presenti mutazioni del pathway BCR come in MYD88, CD79B e PIM1, così come per mutazioni che bloccano il programma di differenziazione delle cellule B come i riarrangiamenti BCL6 e la mutazione/distruzione PRDM1/BLIMP1¹⁷.

Questa distinzione fenotipica è rilevante sia dal punto di vista prognostico che dal punto di vista terapeutico dato che le terapie *target* possono essere preferenzialmente attive in uno solo dei due sottotipi. Sebbene il *profiling* dell'espressione genica venga raramente eseguito nella pratica clinica a breve potrebbero essere disponibili piattaforme idonee alla diagnostica di routine. Ad oggi, l'alternativa più valida, è rappresentata da algoritmi diagnostici basati sull'immunoistochimica, quale l'algoritmo di Hans¹⁹ che può essere utilizzato per suddividere i casi in GCB e non-GCB (quest'ultimo comprendente sia il sottotipo ABC che la maggior parte dei casi non classificati) con una concordanza del 79%.

All'interno della famiglia dei DLBCL NOS recenti analisi genetiche hanno permesso di generare sottotipi geneticamente definiti portando alla proposta di nuove tassonomie per il DLBCL, come la classificazione LymphGen39 e cluster DLBCL40 (Figura 3). Questi schemi di classificazione recentemente proposti, nonostante richiedano ulteriori convalide e la creazione di test riproducibili, hanno l'obiettivo di individuare e delineare meglio entità biologiche distinte, creando le basi per terapie personalizzate.

Biologic Features of DLBCL

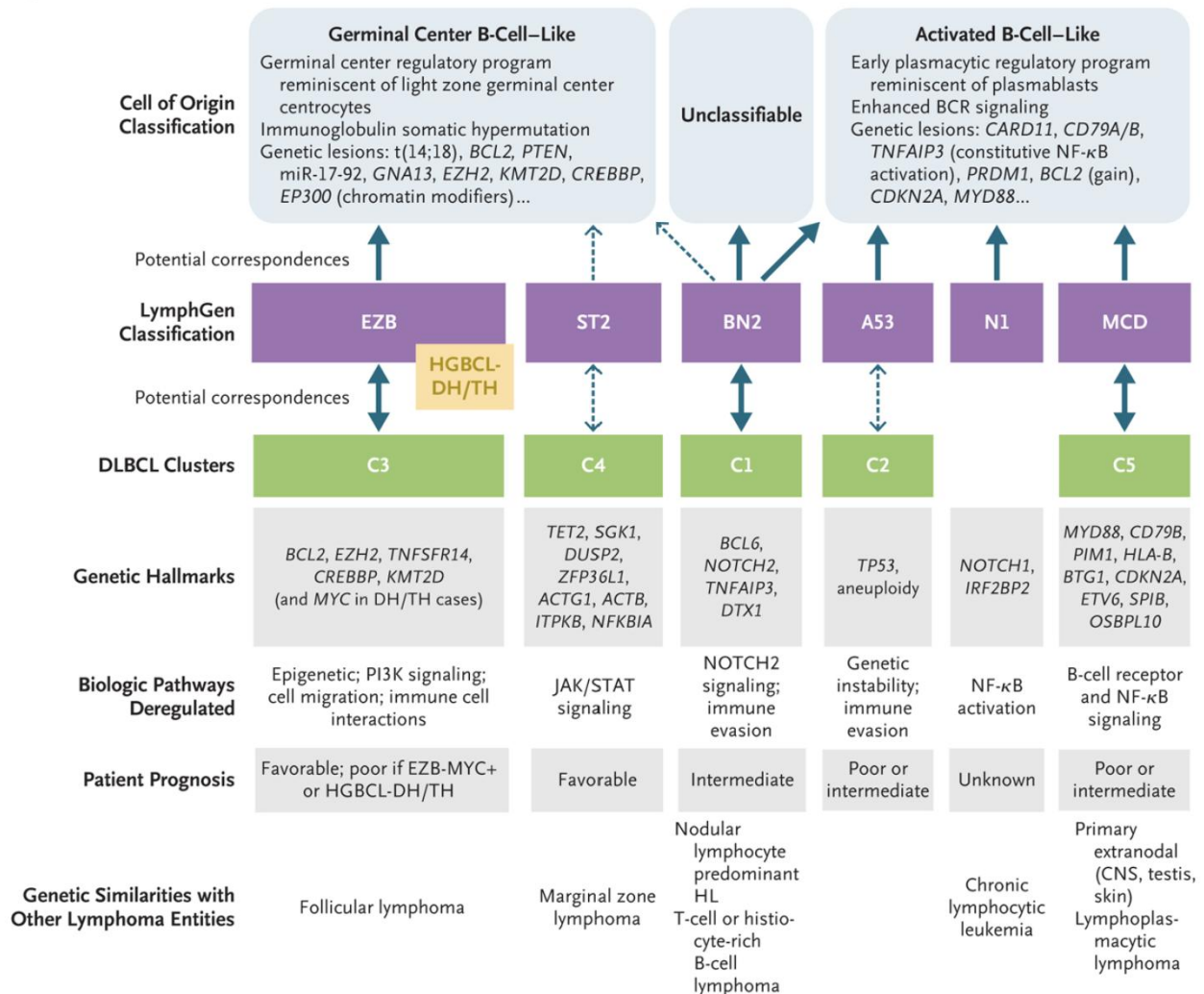


Figura 3. Caratteristiche biologiche e genetiche del DLBCL NOS. Laurie H. Sehn, Diffuse Large B-Cell Lymphoma

Si segnala a livello della nuova classificazione WHO, la creazione della nuova entità "linfoma a cellule B di alto grado con riarrangiamenti MYC e BCL2 e/o BCL6", comunemente indicato come linfoma a doppio o triplo hit. Il 4-8% dei LBCL mostra traslocazioni doppie o triple che coinvolgono i geni MYC e BCL2/BCL6. Nella maggior parte dei casi sono DLBCL del sottotipo GCB^{20,21}. Queste neoplasie sono associate ad un outcome sfavorevole se trattati in prima linea con R-CHOP. I dati suggeriscono che l'outcome avverso associato al linfoma a cellule B di alto grado a doppio o triplo colpo è principalmente evidente quando MYC è traslocato con un partner genico dell'immunoglobulina (raramente valutato nella pratica clinica) e che i riarrangiamenti concomitanti che coinvolgono BCL2 o BCL6 hanno un significato prognostico simile.

In contrasto con la relativa rarità del linfoma a cellule B di alto grado a doppio o triplo hit rilevata, la sovraespressione della proteina MYC misurata mediante analisi immunoistochimica si verifica in circa il 45% dei casi e la sovraespressione della proteina BCL2 si verifica in circa il 65% dei casi (in assenza di un doppio riarrangiamento di MYC e BCL2)²⁰. La

sovraespressione sia di MYC che di BCL2, che si verifica in circa il 30% dei casi di DLBCL, chiamato linfoma doppio espressore, è associata a una prognosi peggiore e rappresenta un'entità biologica distinta, poiché può verificarsi in entrambi i sottotipi GCB e ABC, ma è più comune nel sottotipo ABC.

3.5 STADIAZIONE E CRITERI DI RISPOSTA

Alla conferma diagnostica deve fare seguito una precisa stadiazione di malattia sia a scopo prognostico sia al fine di guidare il percorso terapeutico del paziente. Le indagini strumentali essenziali sono la tomografia computerizzata (TC) di collo torace e addome con mezzo di contrasto iodato e la tomografia a emissione di positroni (PET) con ¹⁸F-fluorodesossiglucosio (FDG). Questi stessi accertamenti saranno poi ripetuti in maniera variabile in corso di trattamento e al termine per valutare il grado di risposta al trattamento. Le stesse metodiche dovranno essere ripetute anche in caso di ricaduta di malattia o in qualsiasi momento si modifichi il percorso terapeutico.

La stadiazione e la valutazione della risposta dovrebbero essere eseguite in accordo con la stadiazione di Ann Arbor (Figura 5) e i criteri di classificazione di Lugano²²⁻²⁴.

Stage	Involvement	Extranodal (E) Status
Limited		
I	One node or a group of adjacent nodes	Single extranodal lesions without nodal involvement
II	Two or more nodal groups on the same side of the diaphragm	Stage I or II by nodal extent with limited contiguous extranodal involvement
II bulky*	II as above with "bulky" disease	Not applicable
Advanced		
III	Nodes on both sides of the diaphragm; nodes above the diaphragm with spleen involvement	Not applicable
IV	Additional noncontiguous extralymphatic involvement	Not applicable

NOTE. Extent of disease is determined by positron emission tomography-computed tomography for avid lymphomas and computed tomography for nonavid histologies. Tonsils, Waldeyer's ring, and spleen are considered nodal tissue.

• Whether stage II bulky disease is treated as limited or advanced disease may be determined by histology and a number of prognostic factors.

Figura 5. Sistema di stadiazione secondo Lugano 2014. Cheson et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification

Negli ultimi decenni la PET-FDG ha sostituito la TC come indagine primaria grazie alla sua maggiore sensibilità nei linfomi FDG avidi²². L'utilizzo della PET all'esordio può determinare un cambiamento di stadio nel 10-30% dei pazienti, portando più spesso ad un *upstaging*, sebbene

questo non sempre comporti una modifica della terapia programmata. Tuttavia, il miglioramento dell'accuratezza dello *staging* garantisce che un numero inferiore di pazienti sia sottotrattato o sovratrattato²⁵. Il ruolo della PET con FDG non si limita all'ambito della stadiazione e della valutazione della risposta, ma sta portando allo sviluppo di nuovi marcatori prognostici come il volume metabolico totale del tumore alla diagnosi²⁶.

L'esecuzione della biopsia del midollo osseo fa parte del percorso di stadiazione convenzionale nei pazienti affetti da LBCL ed è positiva all'esordio nel 15-20% dei casi. Non è più obbligatoria nei pazienti sottoposti a stadiazione PET-TC, nonostante questo possa portare a non intercettare una piccola taglia di malattia presente o la presenza di un concomitante linfoma indolente^{22,27}.

La valutazione della risposta al termine del trattamento viene eseguita mediante PET-TC, con interpretazione della risposta secondo il Deauville score che utilizza come riferimento la captazione di mediastino e fegato. Un punteggio di 1 o 2 e probabilmente 3 è considerato indicativo di una risposta metabolica completa.

Alcuni studi hanno cercato di valutare il valore e il ruolo di una PET-TC *ad interm*, cioè dopo 2 o 4 cicli di trattamento, i dati suggeriscono che questa possa avere un significato prognostico, in particolare quando la risposta viene valutata con l'uso di metodi quantitativi²⁸. Nonostante ciò i dati al momento non giustificano una modifica del trattamento in corso unicamente sull'esito della PET-TC intermedia.

Una volta ottenuta una remissione completa i pazienti devono essere monitorati clinicamente ogni 3-6 mesi per un periodo di 2 anni, quindi ogni 6-12 mesi. I pazienti che mantengono la remissione completa dopo due anni dal momento della diagnosi hanno una sopravvivenza globale attesa che è quasi simile alla sopravvivenza nella popolazione generale, di pari età²⁹. I pazienti devono comunque seguire un *follow up* clinico al fine di identificare eventuali complicanze a lungo termine del trattamento, in particolare tumori secondari, eventi cardiovascolari (la terapia di prima linea prevede l'utilizzo di antracicline) o complicanze infettive tardive.

3.5.1 Fattori prognostici

Il DLBCL è curabile in circa la metà dei casi con la terapia attuale, in particolare in coloro che ottengono una remissione completa con il trattamento di prima linea. I fattori estrinseci del tumore che contribuiscono all'esito includono fra gli altri l'età, le condizioni socioeconomiche, le comorbidità, il *performance status* e le caratteristiche cliniche. Vari score prognostic sono stati individuati e validati negli anni al fine di permettere una più precisa stratificazione prognostica del paziente affetto da DLBCL.

L'Indice Prognostico Internazionale (IPI) è stato sviluppato per valutare quali caratteristiche presenti alla diagnosi predicono la sopravvivenza nei pazienti con linfoma non Hodgkin aggressivo al seguito del trattamento con regimi chemioterapici contenenti doxorubicina. I fattori correlati in modo significativo a una ridotta sopravvivenza globale (OS) o una ridotta sopravvivenza libera da recidiva (RFS) sono: età alla diagnosi >60 anni, performance status secondo l'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) pari a 2 o 3, livelli sierici di LDH

aumentati, presenza di malattia extranodale in più di 1 sito, stadio III-IV secondo Ann Arbor. In base al punteggio ottenuto, i pazienti sono suddivisi in 4 gruppi, consentendo di stratificare il rischio di progressione di malattia e la probabilità di sopravvivenza. Lo studio che ha portato alla sua validazione comprendeva un gruppo iniziale di 2.031 affetti da linfoma non Hodgkin aggressivo trattati con regimi chemioterapici a base di antracicline (non era incluso il rituximab). I tassi di OS a cinque anni per i pazienti con punteggi da zero a uno, due, tre e da quattro a cinque sono risultati rispettivamente del 73, 51, 43 e 26%.³⁰.

I pazienti con età inferiore ai 60 anni possono essere suddivisi in gruppi di rischio mediante l'Indice Prognostico Internazionale aggiustato per età (*age-adjusted IPI*, aa-IPI). I fattori di rischio che contribuiscono al calcolo dell'aa-IPI sono: ECOG >1, aumentati livelli sierici di LDH e stadio secondo Ann Arbor.

L'aggiunta di rituximab alla chemioterapia standard ha portato a miglioramenti nei tassi di OS nei pazienti linfoma CD20-positivo tanto che ad oggi la combinazione di rituximab più CHOP o regimi simili a CHOP è ad oggi il trattamento più comunemente impiegato per il DLBCL. Alla luce della modifica della terapia di prima linea con l'introduzione dell'anticorpo monoclonale il sistema di punteggio IPI originale è stato rivalidato anche in questo gruppo di pazienti³¹.

Altri score prognostici proposti sono:

- Il *Revised International Prognostic Index* (R-IPI); identifica cinque fattori di rischio: età alla diagnosi > 60 anni, ECOG > 2, aumentati livelli sierici di LDH, coinvolgimento di più di 1 sito extranodale e stadio III-IV secondo Ann Arbor. Il punteggio totale, ottenuto dalla somma delle diverse variabili, varia da zero a cinque punti massimo, e classifica i pazienti in tre classi di rischio (very good, good, poor)^{32,33}.
- Il *National Comprehensive Cancer Network IPI* (NCCN-IPI) incorpora informazioni più dettagliate sulle variabili cliniche utilizzate nell'IPI originale (ovvero, età, LDH, performance status ECOG, stadio e malattia extranodale) e consente una maggiore discriminazione tra i pazienti ad alto rischio. Nello specifico, età e LDH sono considerate variabili continue piuttosto che dicotomiche e viene utilizzata la localizzazione della malattia extranodale anziché il numero di siti extranodali³⁴.

Nei pazienti affetti da DLCL la ricaduta di malattia a livello del sistema nervoso centrale (SNC) è relativamente rara, in quanto si verifica in circa il 2-4%³⁵ dei casi, e rappresenta un evento devastante per il malato, in quanto si accompagna ad una sopravvivenza mediana solitamente inferiore a sei mesi^{36,37}.

Nel 2016, Schmitz et al hanno sviluppato il *Central Nervous system* CNS-IPI utilizzando i dati di 2164 pazienti trattati in studi prospettici del *German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group* (DSHNHL). Questo è stato poi convalidato in 1597 pazienti trattati con RCHOP presso la *British Columbia Cancer Agency* (BCCA)³⁸. Da allora, il CNS-IPI è stato adottato per valutare il rischio di recidiva del SNC da diverse linee guida nazionali ed internazionali.

Il CNS-IPI viene calcolato assegnando un punto a ciascuno dei seguenti eventi e sommandoli: presenza di malattia a livello renale o surrenalico, età > 60 anni, LDH elevato, ECOG PS > 1, stadio II-IV secondo Ann Arbor, coinvolgimento di più di un sito extranodale. Il rischio di recidiva del SNC è classificato in base alla somma dei punti e varia in base alla categoria di

rischio: basso, intermedio e alto con tassi di recidiva a 2 anni del 0.6, 3.4 e 10.25 rispettivamente.

3.6 TRATTAMENTO DI PRIMA LINEA

3.6.1 Stadi avanzati

Il trattamento di prima linea del DLBCL si basa sulla chemio-immunoterapia.

Storicamente, otto cicli di CHOP erano considerati il regime chemioterapico standard. L'aggiunta dell'anticorpo monoclonale anti-CD20 rituximab ha successivamente portato a un significativo miglioramento della sopravvivenza complessiva^{39,40} e ad una riduzione del numero dei cicli di chemioterapia a 6. Negli anni diversi studi hanno cercato di implementare tale trattamento intensificando la terapia con o senza trapianto di cellule staminali, o riducendo l'intervallo tra i cicli R-CHOP a 14 giorni, ma non hanno prodotto alcun beneficio in termini di sopravvivenza. Si segnala unicamente uno studio che valutava l'utilizzo di rituximab combinato con doxorubicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina e prednisone (R-ACVBP) che ha mostrato un vantaggio di sopravvivenza rispetto a R-CHOP nei pazienti con un punteggio aa-IPI di 1⁴¹. Tuttavia, il maggior numero di eventi avversi ne hanno limitato l'uso.

La terapia di prima linea è pertanto rimasta immodificata negli anni fino al recente studio POLARIX, studio internazionale di fase 3, in doppio cieco, controllato con placebo⁴², che ha confrontato la terapia con R-CHOP con quella con R-pola-CHP in prima linea, mettendo in evidenza come quest'ultimo schema abbia ottenuto risultati superiori rispetto a R-CHOP negli adulti con DLBCL di nuova diagnosi, a rischio intermedio o alto (un terzo degli 879 pazienti presentava un DLBL e quasi due terzi avevano un punteggio basale IPI compreso tra 3 e 5). L'OS è stata dell'89% per entrambi i gruppi, ma R-pola-CHP ha ottenuto una sopravvivenza libera da progressione del 77% a due anni, rispetto al 70% con R-CHOP. Gli eventi avversi segnalati sono stati gravi nel 30-34% dei pazienti (principalmente neutropenia e anemia) e la neuropatia periferica di grado ≥ 2 si è verificata nel 14-17% dei casi. Alla luce dell'esito di tale studio ad oggi il regime R-pola-CHP è indicato nel trattamento dei pazienti con DLBC all'esordio a rischio IPI intermedio o alto.

Data l'eterogeneità biologica del DLBCL, eventuali terapie *target* possono apportare benefici solo a sottogruppi selezionati di pazienti e richiedendo quindi la valutazione di eventuali biomarcatori. Diversi studi randomizzati hanno valutato l'aggiunta di nuovi agenti a R-CHOP al fine di individuare nuove combinazioni di farmaci che incrementino l'efficacia del regime terapeutico in prima linea. Di seguito ne illustrerò alcuni.

L'anticorpo monoclonale anti-CD20 obinutuzumab non ha apportato un beneficio aggiuntivo rispetto a rituximab^{40,43,44} così come l'aggiunta di bortezomib (inibitore del proteasoma) non ha mostrato alcun vantaggio^{45,46}.

L'associazione con Ibrutinib (inibitore della tirosin chinasi di Bruton) ha prodotto risultati contrastanti. Uno studio di fase 3⁴⁷ che ha confrontato Ibrutinib e R-CHOP con il solo R-CHOP in pazienti affetti da DLBCL non-GCB (selezionati sulla base di test immunoistochimici) e non ha mostrato differenze significative negli esiti tra i gruppi nella popolazione *intention-to-treat*,

ma una analisi secondaria ha suggerito un beneficio in termini di sopravvivenza con l'aggiunta di Ibrutinib per i pazienti di età inferiore a 60 anni.

L'associazione di lenalidomide a R-CHOP (R2-CHOP) è stato analizzato in uno studio randomizzato di fase e ha indicato un possibile miglioramento della sopravvivenza libera da progressione e globale,⁴⁸ ma lo studio definitivo di fase 3 che ha coinvolto pazienti con il sottotipo ABC di DLBCL (selezionato mediante profilo di espressione genica) non ha confermato alcun valore aggiunto della lenalidomide.⁴⁹

Diversi studi di fase 3 non sono riusciti a dimostrare un beneficio in termini di sopravvivenza della terapia di mantenimento dopo R-CHOP, con agenti quali enzastaurina⁵⁰, everolimus⁵¹, o lenalidomide, in aggiunta a precedenti studi negativi sul loro utilizzo come terapia di mantenimento.⁵²⁻⁵⁵

I risultati, anche negativi, ottenuti nel corso degli studi devono essere interpretati nel contesto della nota eterogeneità biologica secondaria alla complessità molecolare del DLBCL, e nella nostra attuale difficoltà ad individuare sottogruppi ancora più contenuti rispetto agli attuali sottotipi identificati per COO.

Sebbene il DLBCL in stadio avanzato venga generalmente trattato con sei cicli di terapia, nella pratica clinica spesso viene eseguita una rivalutazione intermedia tramite PET o TC dopo tre o quattro cicli di trattamento. Ad oggi non vi è nessuna indicazione che intensificare il trattamento in funzione di tale valutazione sia necessario. Nello studio PETAL, i pazienti con malattia PET positiva dopo due cicli di R-CHOP hanno avuto *outcome* peggiori rispetto ai pazienti con PET negativa; tuttavia, l'intensificazione del trattamento per i pazienti PET-positivi non ha migliorato i risultati. Inoltre, la PET *ad interim* può incorrere in falsi positivi (es., risposta infiammatoria alla terapia) e molti pazienti hanno una risposta positiva, nonostante una PET intermedia positiva.⁵⁶⁻⁵⁸

Per quanto riguarda il ruolo della **radioterapia** nel trattamento dei linfomi diffusi a grandi cellule non vi sono dati che dimostrino un vantaggio nell'aggiunta della radioterapia dopo immuno-chemioterapia nei pazienti che ottengono una remissione completa metabolica post trattamento, mentre un consolidamento con RT può essere preso in considerazione in pazienti selezionati che presentino un residuo di malattia captante in PET senza segni di progressione della malattia ematologica^{59,60}. Inoltre la RT può essere valutata in pazienti selezionati, come al presenza di localizzazioni scheletriche isolate, malattia paraspinale o in un paziente anziano con positività PET residua nella malattia inizialmente bulky.

3.6.2 Stadi precoci

Circa il 30% dei pazienti presenta una malattia all'esordio in stadio precoce, comunemente definita come stadio I-II Ann Arbor, non bulky ed in assenza di sintomi sistemici linfoma-relati. Questi pazienti tendono ad avere caratteristiche cliniche a basso rischio ed un esito favorevole. Prima dell'introduzione di rituximab, il trattamento standard consisteva in tre cicli di CHOP e radioterapia delle sedi coinvolte⁶¹, con riscontro di un miglioramene nella OS. Tuttavia, questo vantaggio in termini di sopravvivenza è andato perso con un follow-up più lungo a causa di recidive tardive e di secondi tumori probabilmente correlati alla radioterapia,

suggerendo che la sola chemioterapia potrebbe essere più appropriata. Considerando un tasso di sopravvivenza globale a 5 anni compreso tra l'85 e il 95% in questo sottogruppo di pazienti, gli sforzi si sono concentrati sulla limitazione del numero di cicli di chemioterapia o sull'omissione della radioterapia⁶².

Uno studio randomizzato ha confermato che il trattamento con quattro cicli di R-CHOP da solo è sufficiente per i pazienti di età pari o inferiore a 60 anni con malattia non bulky di stadio I o II che non presentano fattori di rischio aa-IPI.⁶³ In uno studio di fase 3, i pazienti che avevano una risposta metabolica completa, come indicato dalla valutazione PET-CT dopo quattro cicli di R-CHOP, non hanno tratto beneficio dall'aggiunta della radioterapia, sebbene i pazienti con almeno un fattore di rischio IPI abbiano ricevuto sei cicli di R-CHOP.⁶⁴ I risultati di uno studio di fase 2 hanno dimostrato che il trattamento con quattro cicli di R-CHOP da solo sembra essere sufficiente nei pazienti che hanno una risposta metabolica completa come indicato dalla PET-CT dopo tre cicli di R-CHOP^{65,66}. La gestione ottimale non è stata completamente definita per i pazienti con una valutazione PET-CT provvisoria positiva o per quelli con un punteggio IPI modificato per stadio elevato o una malattia con caratteristiche biologiche ad alto rischio.

3.6.3 Pazienti fragili

Circa il 20-25% dei pazienti non sono candidabili al trattamento con la terapia di prima linea standard a causa delle condizioni cliniche generali, comorbidità o età. Nel caso in cui l'ECOG sia buono e le condizioni cliniche all'esordio siano condizionate prevalentemente dalla patologia ematologica stessa devono essere candidati a terapia standard.

La valutazione dell'idoneità mediante una valutazione geriatrica (GA) è il *gold standard* per comprendere lo stato di salute di un individuo anziano, compresi gli ambiti della funzione fisica, cognizione, nutrizione, salute psicologica, supporto sociale, comorbidità e farmaci.⁶⁷

Fondazione Italiana Linfomi (FIL) ha sviluppato una valutazione dell'idoneità specifica per il linfoma (la versione semplificata GA)⁶⁸ e classifica gli anziani con DLBCL in idoneo, non idoneo e fragile in base a quattro criteri: età, attività della vita quotidiana (ADL), ADL strumentali (IADL) e scala di valutazione della malattia cumulativa per la geriatria (CIRS). È importante sottolineare che solo l'età ≥ 80 anni classifica automaticamente un individuo come non idoneo o fragile basato sull'AG semplificato. Tuttavia, il GA semplificato manca di validazione nel contesto del paziente ricaduto/refrattario, nel quale rimane raccomandato l'uso del GA convenzionale.

Per i pazienti fragili e non candidabili a trattamento standard si possono usare, con intento curativo, versioni a dose ridotta di R-CHOP, come R-mini-CHOP⁶⁹. Nei pazienti con una controindicazione all'antraciclina, la sostituzione con gemcitabina o etoposide può fornire risultati soddisfacenti, mentre gli studi di antracicline alternative o agenti cardioprotettivi non hanno fornito prove convincenti di sicurezza o efficacia^{70,71}.

3.6.4 Profilassi del sistema nervoso centrale

La recidiva della malattia a livello del sistema nervoso centrale si verifica nel 3-5% dei pazienti e rappresenta un evento significativo dal punto di vista prognostico con una sopravvivenza globale mediana inferiore a 6 mesi. Si manifesta spesso precocemente dopo il completamento della terapia, suggerendo la presenza di un coinvolgimento occulto del sistema nervoso centrale alla diagnosi.

Il modello di rischio CNS-IPI, che comprende i cinque fattori di rischio IPI e la presenza di coinvolgimento renale o surrenale, stratifica i pazienti in categorie di rischio, con il 12% dei pazienti ad alto rischio di recidiva del SNC (rischio dal 10 al 12%).⁷² Altri fattori possono aumentare questo rischio, incluso il sottotipo ABC, la doppia espressione di MYC e BCL2 e il coinvolgimento testicolare all'esordio^{73,74}. Il ruolo della profilassi del SNC che incorpora agenti sistemici che penetrano nel SNC rimane controverso⁷⁵ e la chemioterapia intratecale profilattica non è più raccomandata per i pazienti affetti da DLBCL.⁷⁶

3.6.5 Terapia del paziente con DLBCL ricaduto/refrattario

Circa il 10-15% dei pazienti trattati con R-CHOP presenta una malattia refrattaria primaria (ovvero una risposta incompleta o una recidiva entro 6 mesi dal trattamento) e un ulteriore 20-25% avrà una recidiva dopo una risposta iniziale, in genere entro i primi 2 anni⁷⁷. I risultati rimangono scarsi per i pazienti in cui il trattamento di prima linea fallisce, in particolare i pazienti con malattia refrattaria, per i quali la sopravvivenza globale mediana è di circa 6 mesi⁷⁸. I pazienti con ricadute tardive (>2 anni dopo il trattamento) hanno prognosi leggermente migliori. IN caso di ricaduta di malattia tardiva si sottolinea la necessità di ripetere la biopsia sia per individuare in immunositochimica eventuali bersagli terapeutici (es CD19) sia perchè si può verificare una recidiva di linfoma indolente⁷⁹.

Prima del dell'avvento della terapia con CAR-T, lo standard di cura per il DLBCL recidivante era la chemioterapia di salvataggio seguita da chemioterapia ad alte dosi con trapianto autologo di cellule staminali (ASCT)⁸⁰. Nel 1995, lo studio Parma⁸⁰ riportava i primi risultati in merito all'efficacia del trapianto autologo in pazienti di età inferiore a 60 anni con linfoma recidivante di grado intermedio o alto, ricaduti/refrattari. Si trattava di uno studio randomizzato di fase 3 condotto in 215 pazienti con linfoma aggressivo recidivato o refrattario, avviati a terapia di seconda linea. I pazienti che ottenevano una risposta parziale o completa dopo due cicli di DHAP venivano assegnati o a due ulteriori cicli DHAP oppure a consolidamento ad alte dosi con supporto di cellule staminali. EFS e OS a 5 anni sono risultate del 46% e 53% per i pazienti del gruppo "alte dosi" e quindi significativamente superiori rispetto a quelle registrate per i pazienti nel braccio di confronto ($p = 0.001$ e $p = 0.038$). Questo studio ha consolidato il ruolo dell'ASCT come standard di cura nei pazienti affetti da DLBCL recidivante di seconda linea e nei pazienti refrattari, sebbene tale gruppo non sia stato studiato specificatamente.

Successivamente altri studi di fase 3 quali CORAL e LY12 hanno analizzato i diversi regimi chemioterapici di salvataggio come rituximab, ifosfamide, carboplatino ed etoposide (R-ICE), R-DHAP e gemcitabina, desametasone e cisplatino, dimostrando un'efficacia simile^{81,82}.

Degli studi CORAL e LY.12 è emerso che i pazienti con malattia refrattaria o con recidiva entro 12 mesi dalla diagnosi risultano avere sopravvivenze significativamente inferiori rispetto ai pazienti che presentano recidiva dopo 12 mesi. In particolare, lo studio CORAL ha mostrato una sopravvivenza libera da progressione a 3 anni di solo il 23%⁸¹ dei pazienti con DLBCL R/R entro 12 mesi dalla diagnosi con precedente esposizione a rituximab.

Il trattamento con chemioterapia ad alte dosi e trapianto autologo di cellule staminali offre un'ottima possibilità di cura nei pazienti con malattia recidivante o refrattaria sensibile alla chemioterapia, ma a causa dell'età avanzata e delle condizioni mediche coesistenti, solo la metà di questi pazienti è considerata candidabile a tale procedura.

Lo studio internazionale SCHOLAR-1 ha valutato retrospettivamente i pazienti con DLBCL refrattario. Questa analisi ha dimostrato che i pazienti che erano refrattari primari, refrattari a due o più linee di terapia o recidivanti entro 1 anno da un ASCT avevano un tasso di risposta globale del 26%, con un tasso di risposte complete alla linea successiva di trattamento del 7% con un OS mediana di 6,3 mesi e solo il 20% dei pazienti era vivo a 2 anni⁷⁸.

Pertanto, l'ASCT può rappresentare un approccio potenzialmente curativo per alcuni pazienti, tuttavia, i sottogruppi ad alto rischio come quelli con malattia refrattaria primaria e quelli con recidiva precoce giustificano la ricerca di una modalità terapeutica diversa.

La terapia con cellule T con recettore dell'antigene chimerico (CAR) è una nuova strategia di trattamento che ha migliorato i risultati nei pazienti con linfomi R/R e sta rivoluzionando l'approccio terapeutico a questa malattia, mettendo in discussione anche il ruolo del trapianto autologo in II linea.

La terapia con cellule T CAR è una terapia con cellule effettrici immunitarie in cui le cellule T autologhe sono geneticamente progettate per colpire l'antigene CD19 sulle cellule di linfoma. I pazienti in attesa di terapia con cellule CAR-T possono richiedere una terapia ponte, che può comprendere steroidi, chemioterapia, immunoterapia o radioterapia con scopo di mantenere il controllo della malattia fino al termine dell'ingegnerizzazione del prodotto cellulare. Prima dell'infusione di cellule CAR-T, i pazienti ricevono chemioterapia linfodepletiva, spesso con fludarabina e ciclofosfamide.

Sulla base di studi pilota di fase II, tre costrutti CAR-T, vale a dire axicabtagene ciloleucel (axi-cel), lisocabtagene maraleucel (liso-cel) e tisagenlecleucel (tisa-cel), sono stati successivamente approvati⁸³⁻⁸⁵. Nello studio zuma-1 sono stati arruolati 111 pazienti con LBCL R/R trattati con axi-cel ottenendo un ORR dell'82% e un tasso di RC del 54%. L'OS a 18 mesi è stata del 52%.⁸³ Nello studio TRANSCEND, i pazienti con LBCL R/R sono stati trattati con liso-cel e dei 344 il 54% ha ottenuto una risposta completa con un ORR del 74%. L'OS mediana è stata di 21,1 mesi dopo un follow-up di 17,5 mesi⁸⁵. Nello studio JULIET, sono stati arruolati 93 pazienti con DLBCL R/R e tutti i pazienti hanno ricevuto la terapia con tisa-cel. L'ORR è stato del 52% con un tasso di CR del 40%⁸⁴. I risultati a lungo termine con un follow-up di oltre 4 anni per ZUMA-1 hanno dimostrato un'OS mediana di 25,8 mesi con un tasso di OS a 4 anni del 44%, suggerendo una possibile cura per un sottogruppo di DLBCL R/R⁸⁶. Ad un follow-up mediano di 40,3 mesi per JULIET, l'ORR è stato del 53%, con il 39% dei pazienti che ha raggiunto una CR⁸⁷.

Questi studi hanno dimostrato la sicurezza, l'efficacia e la durata della risposta della terapia con cellule CAR-T come terapia di terza linea per pazienti affetti da DLBCL R/R. Date le risposte ottenute in questi studi di fase 2 si è proceduto ad indagare l'efficacia e la sicurezza di tali trattamenti nel contesto di DLBCL R/R di seconda linea ad alto rischio, creando così un cambiamento di paradigma nel trattamento del DLBCL.

Sono stati condotti tre studi pilota di fase 3, ZUMA-7, TRANSFORM e BELINDA, che hanno esplorato l'uso di axi-cel, liso-cel e tisa-cel, rispettivamente, nel contesto di seconda linea in pazienti idonei al trapianto con malattia refrattaria o ricaduta precoce. Il confronto è stato eseguito con chemioterapia di salvataggio standard scelta dallo sperimentatore, seguita da chemioterapia ad alte dosi e ASCT⁸⁸⁻⁹⁰. I risultati hanno mostrato un EFS migliorata con axi-cel⁸⁸ o liso-cel⁹¹ rispetto ad ASCT, incluso un beneficio in termini di OS per axicel⁹².

Come per il paziente all'esordio anche il paziente ricaduto/ refrattario potrebbe presentare delle fragilità cliniche tale da renderlo non eleggibile al trapianto di cellule staminali autologhe e/o alla terapia con CAR-T.

Inizialmente sono emerse preoccupazioni sull'adeguatezza della terapia CAR-T per i pazienti anziani a causa del potenziale rischio di grave tossicità, inclusa la sindrome da rilascio di citochine (CRS) e sindrome da neurotossicità associata alle cellule immunitarie effettrici (ICANS). Per risolvere questo problema, diversi recenti studi di coorte multicentrici hanno cercato di valutare l'impatto dell'età sull'efficacia e sicurezza della terapia CAR-T.^{93,94}

Questi studi hanno riscontrato risultati clinici e tossicità comparabili tra pazienti di età superiore o inferiore a 70 anni trattati con axi-cel o tisa-cel. L'analisi dello studio clinico zuma-1, che ha valutato axi-cel nella terza linea o successivamente il trattamento del DLBCL, ha riportato una risposta ed esiti di tossicità simili nei pazienti di età ≥ 65 anni rispetto ai pazienti più giovani.⁹⁵ Allo stesso modo, in un'analisi di sottogruppi pre-pianificata di axi-cel di seconda linea (ZUMA-7)⁹⁶ rispetto allo standard di cura, sono stati riscontrati tassi di risposta e EFS mediana simili tra i pazienti >65 anni e quelli più giovani. Si sono verificati più CRS e ICANS di grado elevato nei pazienti più anziani rispetto alla popolazione complessiva, ma non è stata eseguita un'analisi statistica. Questo risultato è paragonabile ad un'esperienza tedesca numericamente più elevata (anche se non statisticamente significativa) che riporta differenze negli ICANS di alto grado nei pazienti trattati con axi-cel o tisa-cel⁹⁷. Complessivamente, queste indagini suggeriscono una possibile maggiore incidenza di tossicità neurologica che richiede validazione e ulteriori studi, ma sottolineano che la sola età cronologica non dovrebbe essere una controindicazione alla terapia CAR-T.

Lo studio di fase 2 PILOT⁹⁸, volto a valutare l'efficacia di liso-cel, ha reclutato pazienti con DLBCL R/R considerati non idonei all'ASCT. Nello specifico, i pazienti dovevano soddisfare uno dei seguenti criteri: età pari o superiore a 70 anni, performance status ECOG pari a 2, aver ricevuto una precedente linea terapeutica contenente un'antraciclina e un agente mirato anti CD20, LVEF $<50\%$, clearance della creatinina <60 ml/min o transaminasi due volte il limite superiore della norma. Settantaquattro pazienti sono stati sottoposti a leucaferesi, di cui 61 hanno ricevuto terapia con liso-cel. Le caratteristiche di base erano rilevanti per un'età media di 74 anni, il 26% aveva un ECOG di 2 e il 42% aveva un punteggio aa-IPI ≥ 2 . Il 54% dei pazienti aveva una malattia refrattaria, il 21% aveva avuto una recidiva entro 1 anno dal trattamento di

prima linea e il 25% aveva avuto una recidiva 12 mesi dopo il trattamento di prima linea. Con un follow-up mediano di 12,3 mesi, l'ORR è stato dell'80% e il tasso di RC è stato del 54%. La PFS mediana è stata di 9,03 mesi e l'EFS è stata di 7,23 mesi. Tra i pazienti che hanno raggiunto la RC, la PFS mediana è stata di 22,6 mesi e l'EFS è stata di 22,6 mesi. La sindrome da rilascio di citochine è stata osservata nel 38% e la neurotossicità nel 31%, per lo più di basso grado. Non sono state segnalate CRS o neurotossicità di grado 4 o 5. Gli eventi avversi correlati al trattamento sono stati simili a quelli precedentemente riportati e non si sono verificati decessi associati allo studio.

Per i pazienti non idonei al trapianto e senza accesso alla terapia con cellule CAR-T, sarebbe raccomandabile, se possibile, l'arruolamento in uno studio clinico o altri regimi terapeutici approvati quali tafasitamab con lenalidomide, polatuzumab-vedotin con bendamustina e rituximab (pola-BR), R-GemOx o loncastuximab tesirine

Tafasitamab, un anticorpo monoclonale umanizzato anti-CD19, è stato valutato in associazione con lenalidomide nello studio L-MIND^{99,100}, che ha arruolato pazienti con DLBCL R/R non idonei per ASCT in seconda linea. È importante sottolineare che in questo studio sono stati esclusi i pazienti con malattia refrattaria primaria definita come nessuna risposta o malattia progressiva entro 3 mesi dalla terapia di prima linea. Sono stati arruolati ottantuno pazienti, di cui il 56% di età superiore a 70 anni; il 75% dei pazienti aveva una malattia in stadio III-IV, con il 51% che aveva un punteggio IPI ≥ 3 ; solo il 18,5% dei pazienti aveva una malattia refrattaria primaria e il 43,8% era refrattario all'ultima linea di trattamento. Dopo un follow-up mediano di 35 mesi, l'ORR è stato del 57,5% e il tasso di CR è stato del 43%, con una PFS mediana di 11,6 mesi e un'OS mediana di 33,5 mesi. Per i pazienti che hanno ottenuto una CR, la PFS mediana e l'OS mediana non sono state raggiunte.

Polatuzumab-vedotin è un coniugato farmaco-anticorpo mirato al CD79b con un carico di monometilauristatina E, un inibitore dei microtubuli¹⁰¹. In uno studio di fase I/II¹⁰², pola-BR è stato confrontato con BR da solo in pazienti non idonei all'ASCT con DLBCL R/R. In studi precedenti, il solo BR in questa popolazione di pazienti aveva una PFS mediana di 3,6-6,7 mesi^{103,104}. Per questo studio sono stati inclusi pazienti con DLBCL R/R dopo almeno una precedente linea di terapia. Sono stati arruolati 118 pazienti, di cui 67 sottoposti a terapia con pola-BR. Nel gruppo pola-BR il 25% aveva fallito un precedente ASCT e il 30% aveva avuto una risposta insufficiente alla terapia precedente. Dopo un follow-up mediano di 22,3 mesi, la PFS è stata di 9,5 mesi, nel gruppo pola-BR rispetto a 3,7 mesi nel gruppo BR-solo, e l'OS è significativamente migliorata, con pazienti con pola-BR che sopravvivono per 12,4 mesi rispetto a pazienti con BR che sopravvivono per 4,7 mesi.

Loncastuximab tesirine è un coniugato farmaco-anticorpo mirato al CD19 coniugato a un agente alchilante citotossico, SG3199.14, che viene internalizzato dalle cellule B impedendone la replicazione e provocando l'apoptosi. Nello studio di fase 2 LOTIS-2 sono stati arruolati pazienti con due o più linee di trattamento per DLBCL o malattia refrattaria primaria. Dei 184 pazienti arruolati, il 39% aveva una malattia refrattaria primaria, il 24% ha avuto una recidiva entro 3 mesi dalla terapia di prima linea e il 39% ha avuto una recidiva entro 6 mesi dalla terapia di prima linea. L'età media era di 66 anni, con il 10% affetto da DLBCL doppio o triplo. L'ORR è stato del 48,3% (IC al 95%, 39,9%-56,7%), la PFS mediana è stata di 4,9 mesi e

l'OS mediana è stata di 9,9 mesi. Il tasso di CR è stato del 24,1% e dei pazienti in CR, il 57% ha continuato la CR al momento del cut-off dei dati¹⁰⁵

Sebbene la terapia con cellule CAR-T sembri promettente per il trattamento del DLBCL R/R, sono in corso nuove strategie di trattamento che potrebbero aggirare i problemi di produzione e di costo. Gli attivatori bispecifici delle cellule T (BITE) che prendono di mira il CD20 hanno dimostrato risultati eccellenti. Ci sono almeno quattro BITE attualmente in commercio o in corso di trial clinici, tra cui mosunetuzumab, glofitamab, epcoritamab e odronextamab.

Glofitamab è un BITE che si lega in modo 2:1 al C20 sulle cellule B e al CD3 sulle cellule T. In uno studio di fase 1 su 171 pazienti affetti da NHL che erano stati sottoposti ad almeno una linea di trattamento per i pazienti con istologie di NHL aggressivo, l'ORR è stata del 48% con un tasso di RC del 33,1%. La CRS si è verificata nel 50,3% nella maggior parte dei casi di grado 1 (21,6%) o di grado 2 (25,1%)¹⁰⁶. Nello studio di fase 2, i pazienti sono stati trattati con glofitamab per 12 cicli o fino alla progressione della malattia. Nella coorte di 154 pazienti con un follow-up mediano di 12,6 mesi, il 39% dei pazienti ha ottenuto una RC e la PFS a 12 mesi è stata del 37%¹⁰⁷. Dati recenti hanno dimostrato che il trattamento limitato nel tempo con glofitamab può determinare una RC duratura, infatti, dei 61 pazienti che avevano ricevuto glofitamab per 1 anno con un follow-up mediano di 18.1 mesi, la maggioranza dei pazienti (45) ha mantenuto la RC¹⁰⁸.

Epcoritamab è un BITE che lega il CD3 sulle cellule T e il CD20 sulle cellule B e viene somministrato per via sottocutanea. In uno studio di fase I/II, sono stati reclutati 157 pazienti affetti da DLBCL o altro NHL aggressivo con due o più linee terapeutiche, non idonei all'ASCT. I pazienti hanno ricevuto una media di tre linee di terapia (range: 2-11), il 61,1% aveva una malattia primaria refrattaria e il 75,8% era refrattario a due o più linee di terapia; si segnala che il 38,9% aveva ricevuto in precedenza una terapia con cellule CAR-T. L'ORR è stato del 63,1% con un tasso di RC del 38,9%. Nel complesso, epcoritamab si è dimostrato tollerabile, con gli eventi avversi più comuni che sono stati CRS (49,7%), reazione nel sito di iniezione (19,7%) e neutropenia (17,8%)¹⁰⁹.

Mosunetuzumab è un anticorpo bispecifico che recluta le cellule T ed è diretto contro il CD20 ed il CD3, avendo come obiettivo le cellule B che esprimono CD20. La coorte di espansione di uno studio di fase I-II¹¹⁰ ha verificato la sua sicurezza ed efficacia nei pazienti con DLBCL recidivante/refrattario (R/R). Sono stati arruolati 88 pazienti (73,9% DLBCL de novo; 26,1% linfoma follicolare trasformato) con ottenimento di un ORR del 95% e RC del 23,9%, nel dettaglio le RC nei 26 pazienti che avevano già ricevuto terapia con CAR-T è stato del 12%. La CRS è stata uno degli eventi avversi più comuni e si è manifestata nel 26.1% dei pazienti, nella maggior parte dei casi di grado 1 e 2.

4 IL MICROBIOMA INTESTINALE E IL RUOLO NELLA PATOGENESI E NELLA TERAPIA DEL CANCRO

Il **microbiota** è composto dall'insieme dei microrganismi simbiotici che popolano l'essere umano. L'interazione tra il microbiota e l'ospite mutualistica è in grado di influenzare quest'ultimo sia in condizioni di salute che di malattia^{111,112}. Questa popolazione è complessa e la sua composizione presenta una grande variabilità sia tra soggetti diversi che all'interno dello stesso soggetto in termini spazio-temporali. La sua composizione è influenzata da caratteristiche intrinseche ed estrinseche all'ospite quali lo stile di vita e, in particolare, le abitudini alimentari.

Il **microbioma** rappresenta il patrimonio genetico del microbiota. Il suo studio avviene attraverso tecniche di *next generation sequencing* (NGS) e da metodi volti ad analizzare il metaboloma. A questo scopo sono nati molteplici studi, tra cui lo *Human Microbiome Project* (HMP)¹¹³ ed il *Metagenomics of the Human Intestinal Tract* (MetaHIT) che hanno permesso di ottenere notevoli progressi nel caratterizzare la struttura del microbiota umano e della sua interazione con l'ospite.

4.1 IL MICROBIOTA INTESTINALE

Tutte le superfici del corpo umano che comunicano con l'esterno sono popolate da un ecosistema di microrganismi che comprende batteri, virus, protozoi, funghi e archaea e che includono fra le 500 e 1.000 specie diverse. Si stima che questo insieme di microrganismi, il microbiota, sia composto da un numero di microrganismi maggiore di 10^{14} e che quindi sia circa dieci volte più numeroso delle cellule del corpo umano¹¹⁴.

Per numerosità, implicazioni cliniche, facilità di raccolta dei campioni e studi condotti il microbiota più studiato è rappresentato da quello del tratto gastrointestinale, *gut microbiota* (GM). La maggior parte delle specie che compongono il microbiota del tratto gastrointestinale sono incluse nei cinque phyla principali nella classificazione tassonomica con particolare predominanza di 2 soli phyla che insieme comprendono circa il 85-95% del totale dei microrganismi: Firmicutes (60%–80%), Bacteroidetes (15%–25%), Actinobacteria (2,5%–5%), Proteobacteria (1%–10%) e Verrucomicrobia (0,1%–2,2%).

Il numero di microrganismi e la sua composizione qualitativa varia in funzione del sito anatomico analizzato. Nella cavità orale il numero di microrganismi è molto elevato ed è costituito principalmente da Proteobacteria e Firmicutes, questi ultimi presenti in numero ancora maggiore a livello esofageo. Nello stomaco vi sono molti meno batteri e tra questi i più abbondanti sono i Firmicutes, i Proteobacteria e gli Actinobacteria. Questa riduzione numerica è secondaria al pH molto basso dovuto alla secrezione acida. A livello duodenale si conferma una bassa numerosità di microrganismi a causa del breve tempo di transito, l'intensa attività motoria propulsiva del viscere impedisce una colonizzazione stabile del lume, e della

secrezione di bile e fluidi pancreatici che uccidono la maggior parte dei batteri ingeriti. La composizione batterica a questo livello sembra avere un ruolo in alcune malattie come la sindrome dell'intestino irritabile (IBS)¹¹⁵. Procedendo nel tratto gastrointestinale si va incontro ad un progressivo aumento del numero di specie. Il microbiota è particolarmente abbondante a livello colico grazie all'ambiente favorevole alla crescita batterica dovuta alla grande disponibilità di substrati, al lungo tempo di transito, la pronta disponibilità di nutrienti ed un pH favorevole^{116,117}. Nell'ileo e nel colon, dove avviene l'assorbimento degli acidi biliari, si trovano una miriade di batteri, tra cui *Ruminococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Peptococcus*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Clostridium*, e molti altri meno abbondanti come *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Fusobacteria*^{118–120}.

Si definisce **disbiosi** un'alterazione della struttura locale del microbiota sia in composizione che funzionalità, come un aumento delle popolazioni di batteri patogeni (eccesso di patobionti) o riduzione dei batteri commensali, riduzione della diversità batterica e deterioramento dell'equilibrio funzionale. La disbiosi influisce negativamente sulla salute dell'ospite impedendo il regolare funzionamento del sistema immunitario e può svolgere un ruolo nella patogenesi di alcune malattie¹²¹ quali patologie infiammatorie^{122–124}, disturbi metabolici¹²⁵ e tumori¹²³.

Si definisce **diversità beta** (*beta-diversity*) la variabilità tassonomica inter-individuale: in genere le caratteristiche funzionali del microbiota nel soggetto sano sono relativamente simili e coinvolgono vari processi metabolici quali fermentazione, putrefazione, sintesi di vitamine, acidi grassi a catena corta (*short chain fatty acids*, SCFAs) e amminoacidi essenziali.

Si definisce **diversità alfa** (*alfa-diversity*) la variabilità intra-individuale; infatti, il microbiota è capace di modificare la sua composizione in risposta a variabili sia intrinseche che estrinseche all'ospite.

Partendo dalla grande variabilità si è arrivati all'identificazione di un set di geni stabile e comune alla maggior parte delle persone, definito *microbiome core*, che interagisce ed è complementare alla componente variabile che è influenzata da fattori esterni ed interni all'ospite quali dieta, stimoli infiammatori e più in generale lo stile di vita. Lo scambio di materiale genetico tra il *core microbioma* e la riserva flessibile fornisce all'ospite un vantaggio di adattamento all'ambiente^{126–130}. La stabilità del microbioma è rappresentata dalla sua capacità di resistere ai cambiamenti e dalla capacità di tornare ad una condizione di equilibrio dopo una perturbazione (Figura 6).

La composizione e la diversità del microbioma possono variare nel corso degli anni: se il primo anno di vita è fondamentale per la costituzione del microbioma, questo poi evolve in modo variabile nell'età adulta da persona a persona^{131–133}.

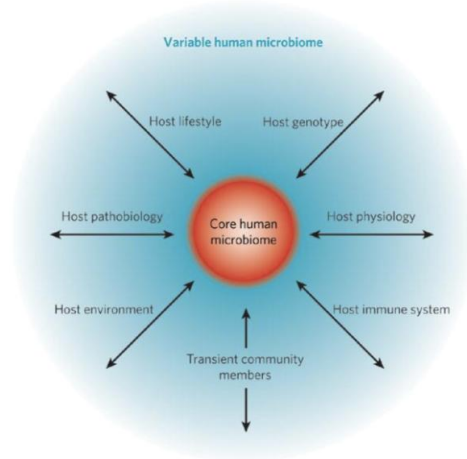


Figura 6. Core microbioma e microbioma flessibile. Turnbaugh P. et al, Nature 2007

La colonizzazione del tratto gastrointestinale inizia già alla nascita con *Bacteroides* e *Bifidobacteria* in caso di parto vaginale. Oltre al tipo di parto, anche il tipo di alimentazione è un fattore determinante e significativo del microbiota intestinale dei neonati. In caso di allattamento con latte materno ritroveremo *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* mentre in caso di utilizzo di latte artificiale si riscontrano *Enterococcus*, *Enterobacteria*, *Bacteroides*, *Clostridium* e altri batteri anaerobi¹³⁴.

Come precedentemente accennato, lo stile di vita, in particolare le abitudini alimentari, svolge un ruolo significativo nella modulazione del microbioma intestinale, influenzandone la composizione e la funzione attraverso modifiche della diversità microbica, tassonomia microbica, delle espressioni geniche e delle attività enzimatiche. Tutti i fattori che singolarmente o in combinazione, influenzano il microbioma intestinale e la sua alterazione è correlata a varie malattie, tra cui obesità, diabete di tipo 2, aterosclerosi, cancro, malattie neurologiche e psichiatriche, malattie infiammatorie intestinali (IBD) e malattie autoimmuni^{135,136}.

Il contenuto di macronutrienti della dieta, alcuni alimenti specifici (probiotici, alimenti fermentati, contenuto di fibre, semi oleosi e frutta) e la dieta complessiva hanno il potenziale di modulare il microbioma intestinale in breve tempo. In uno studio che esaminava gli effetti delle abitudini alimentari a breve e lungo termine sul microbioma, è stato dimostrato che le abitudini alimentari a lungo termine sono associate a tre enterotipi: *Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcus*. Gli enterotipi *Bacteroides* sono stati riscontrati in diete ricche di proteine e grassi animali e gli enterotipi *Prevotella* in diete ricche di carboidrati complessi¹³⁷. Una elevata assunzione di fibre nella dieta a lungo termine può modellare l'enterotipo del microbiota, in particolare la colonizzazione di *Prevotella*¹³⁸. In un altro studio, la produzione di butirrato è aumentata quando è stato aumentato il contenuto di fibre della dieta mentre sono diminuiti il contenuto di grassi, la sintesi secondaria di acidi biliari, la proliferazione della mucosa del colon e l'infiammazione¹³⁹.

Oltre alla dieta, anche i trattamenti antibiotici, i patogeni invasivi, l'assunzione di farmaci o lo

stress possono disturbare l'equilibrio degli organismi e causare disbiosi. Diversi studi hanno dimostrato come il microbiota venga influenzato dalla somministrazione di terapia antibiotica così come l'utilizzo eccessivo di antibiotici porti ad un aumento dei patogeni resistenti¹⁴⁰⁻¹⁴¹.

I batteri commensali rappresentano un ulteriore meccanismo di resistenza alla colonizzazione di microbi esogeni potenzialmente patogeni. La loro azione protettiva viene esercitata grazie a diversi meccanismi: competono per i siti di attacco sull'orletto a spazzola delle cellule epiteliali intestinali, producono sostanze antimicrobiche e competono con i nutrienti per i batteri potenziali patogeni¹⁴²⁻¹⁴⁵.

La flora intestinale come riportato sopra svolge un ruolo metabolico, protettivo e interviene anche nello sviluppo e nella regolazione del sistema immunitario attraverso l'influenza esercitata nello sviluppo dei linfociti B e nella regolazione dei linfociti T helper. Diversi studi sui topi hanno dimostrato che le cellule dendritiche tollerogeniche e le cellule T regolatrici (Treg) sono assenti nei topi germ-free e che sia i batteri commensali che i loro metaboliti, come l'acido butirrico, sono necessari per lo sviluppo dei Treg¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

I carboidrati digeribili vengono scomposti nei loro monomeri e assorbiti dall'intestino tenue, mentre i carboidrati non digeribili raggiungono il colon e la loro fermentazione è fonte di energia. Le fibre sono resistenti alla digestione nell'intestino tenue a causa della conformazione del legame glicosidico, gli enzimi dell'intestino tenue non possono, infatti, scindere i legami di tipo β , presente ad esempio nella cellulosa.

Nel cieco e nel colon destro, la fermentazione è molto intensa con un'elevata produzione di SCFA, ossia acido acetico, propionico e butirrico, che generano un pH acido e una rapida crescita batterica. Al contrario, il substrato nel colon sinistro o distale è meno disponibile alla fermentazione i processi putrefattivi diventano più importanti. La putrefazione è un altro processo metabolico anaerobico di peptidi e proteine. Produce anch'essa SCFA ma, allo stesso tempo, genera sostanze potenzialmente tossiche tra cui ammoniaca, ammine, fenoli, tioli e indoli¹⁴⁹.

Come descritto gli SCFA vengono rilasciati a causa della fermentazione di alcuni componenti dietetici, in particolare la fibra alimentare¹⁵⁰ e hanno funzioni importanti nella fisiologia dell'ospite. Il butirrato sembra avere un effetto protettivo contro il cancro del colon, l'acetato e il propionato possono svolgere un ruolo come modulatori del metabolismo del glucosio e del colesterolo, il butirrato e il propionato favoriscono la transizione delle feci¹⁵¹⁻¹⁵³. Fra i vari effetti esercitati dai SCFA vi è anche una capacità immunomodulatoria attraverso la soppressione di NF- κ B e/o l'azione sui recettori accoppiati alle proteine G e l'aumento dell'espressione del gene Treg¹⁴⁷. Questo effetto si traduce, per alcuni studi, in un aumento della tolleranza immunologica e della protezione da malattie infiammatorie o allergiche¹⁵⁴.

Inoltre, i batteri che producono SCFA sembrano influenzare il ciclo degli enterociti nel colon, ad esempio il butirrato inibisce la proliferazione cellulare e stimola la differenziazione nelle

linee cellulari neoplastiche epiteliali in vitro^{155,156}. I meccanismi alla base della prevenzione del cancro da parte delle fibre non sono ovviamente correlati al solo butirrato. I tipi di fibre insolubili come la cellulosa non vengono fermentati dai batteri intestinali e accelerano il transito riducendo, quindi, l'esposizione delle cellule del colon e dei cancerogeni esogeni¹⁵⁷.

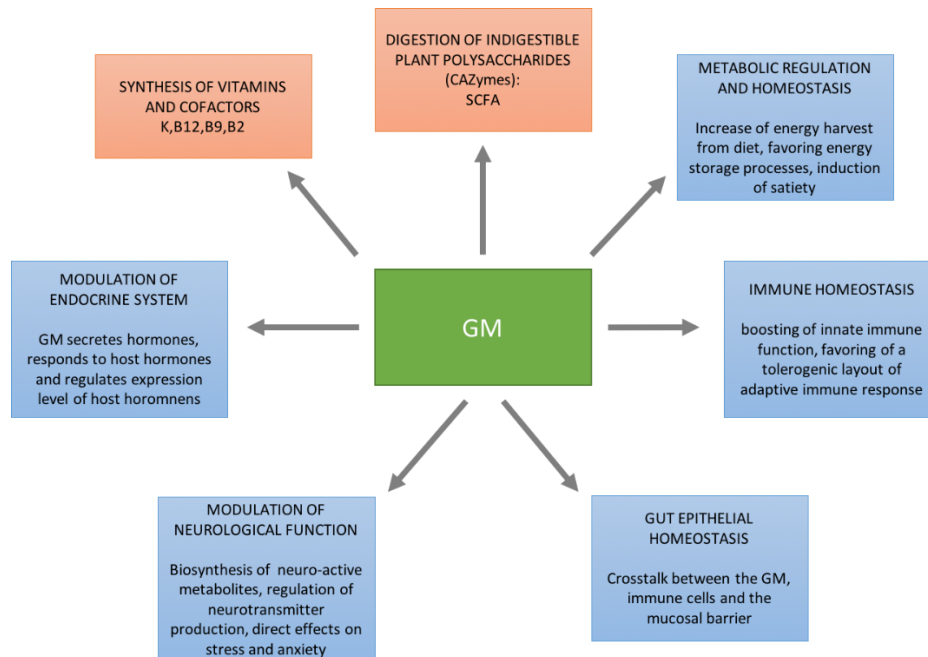


Figura 7. principali funzioni del microbiota intestinale

4.2 MICROBIOTA E NEOPLASIE EMATOLOGICHE

I tumori sono generalmente riconosciuti come una malattia multifattoriale in cui sono coinvolti sia una componente genetica che una componente ambientale. Fra le componenti ambientali o estrinseche i microrganismi sono coinvolti in circa il 20% dei casi¹⁵⁸. In ambito ematologico diversi studi hanno analizzato la relazione fra microbiota, patologia onco-ematologica, il suo trattamento e le sue possibili complicanze.

Negli ultimi anni vari studi ci hanno mostrato come le variazioni del microbiota siano diverse a seconda delle singole patologie ematologiche. Tuttavia la relazione fra la composizione del microbiota, patologia e trattamento non sono ancora del tutto chiare.

I farmaci utilizzati rappresentano indubbiamente un elemento importante nell'alterare l'equilibrio del microbiota intestinale portando a disbiosi, che può a sua volta influenzare i risultati del trattamento stesso della malattia. Gli antibiotici sono fra i farmaci più utilizzati in corso di terapia per una patologia ematologica, sia con intento curativo che in profilassi.

Nell'analisi del microbioma in pazienti pediatrici con leucemia o linfoma, sia gli antibiotici che gli antimicotici sono stati collegati ad una riduzione generale della diversità nei campioni di feci, compresa una diminuzione dell'abbondanza relativa nei produttori di butirrato che come abbiamo visto svolgono un ruolo critico nella fisiologia intestinale dell'ospite (ad esempio,

Faecalibacterium, Anaerostipes, Dorea, Blautia). Inoltre, l'uso di antimicotici è stato associato a un aumento significativo dell'abbondanza relativa di patogeni opportunisti¹⁵⁹.

Viaud et al. hanno dimostrato nel modello murino che la somministrazione di ciclofosfamide porta a mucosite e successiva traslocazione di batteri Gram-positivi nei linfonodi mesenterici e nella milza, seguita da un aumento di interferone- γ e di un sottoinsieme di cellule T spleniche secernenti interleuchina 17¹⁶⁰. Inoltre, i topi portatori di tumore andavano incontro ad una minor riduzione del carico tumorale se pretrattati con antibiotici, mentre l'iniezione di cellule patogene TH17 nei topi pretrattati con antibiotici ripristinava l'effetto antitumorale della ciclofosfamide. La riduzione di efficacia della ciclofosfamide era più pronunciata dopo l'esposizione a un antibiotico attivo sullo spettro Gram-positivo, rispetto agli antibiotici che prendevano di mira lo spettro Gram-negativo.

In un altro studio, pubblicato nel 2013, Lida et al. sono stati identificati specifici batteri Gram-positivi in grado di promuovere l'efficacia antitumorale della combinazione immunoterapica mediante l'innescò di cellule mieloidi infiltranti il tumore¹⁶¹. Entrambi i lavori sopracitati hanno dimostrato un collegamento tra la somministrazione di antibiotici mirati ai patogeni Gram-positivi, la composizione del microbiota intestinale e l'efficacia del trattamento antineoplastico nei topi. Non è chiaro se questi risultati siano trasferibili agli esseri umani e, al fine di definire meglio questi aspetti, Pflung et al.¹⁶², in uno studio pubblicato nel 2016, ha indagato potenziali associazioni fra utilizzo di un antibiotico anti-Gram-positivo e l'esito della terapia antiblastica. Per riuscire a studiarlo all'interno di un contesto clinico sono state identificate due popolazioni di pazienti: 1. pazienti trattati con una terapia di prima linea contenente ciclofosfamide per la leucemia linfatica cronica (LLC), 2. pazienti trattati con un regime contenente cisplatino per il linfoma ricaduto. I dati, in particolare, provenivano dallo studio CLL8 e dalla *Cologne Cohort of Neutropenic Patients*. Tra gli 800 pazienti con LLC disponibili, 45 avevano ricevuto terapia con antibiotici anti-Gram-positivi. Le analisi hanno evidenziato: ORR significativamente inferiore (74,3% vs. 90,2%), PFS ridotta (PFS mediana 14,1 vs. 44,1 mesi) e OS ridotta (OS mediana 56,1 vs. 91,7 mesi). L'analisi multivariata ha mostrato un'associazione indipendente fra assunzione di antibiotico anti GRAM positivo e PFS. Dei 122 pazienti con linfoma recidivante, quelli trattati con antibiotici anti-Gram-positivi (n = 21/122) hanno ottenuto un tasso di OR significativamente più basso (70,3% vs. 42,9%) e una progressione significativamente più precoce rispetto agli altri (PFS mediana 2,3 vs. 11,5 mesi). Per quanto riguarda l'analisi multivariata, l'uso di antibiotici anti-Gram-positivi è stato indipendentemente associato a una riduzione di PFS e OS.

Nel contesto del trapianto di cellule staminali ematopoietiche numerosissimi studi hanno indagato la relazione tra GM e le sue possibili espressioni, quali malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD), infezioni, ricostituzione immunitaria e ricadute. Gli studi hanno dimostrato cambiamenti nel microbiota durante la fase di condizionamento, con agenti chemioterapici che danneggiano le cellule epiteliali intestinali e aumentano la suscettibilità alla batteriemia¹⁶³⁻¹⁶⁶. Inoltre è stato evidenziato come il regime di condizionamento utilizzato prima dell'HSCT possa alterare significativamente il microbioma intestinale, superando persino gli effetti del trapianto stesso¹⁶⁷. La GVHD grave è stata associata a una maggiore

abbondanza di Enterobacteriaceae, mentre i Clostridia sono stati collegati a risposte antinfiammatorie¹⁶⁸.

Nell'ambito dei linfomi, più nello specifico nei DLBC oggetto di questa trattazione, Yuan et al.¹⁶⁹ hanno caratterizzato il microbiota intestinale di 25 individui non trattati con linfoma diffuso a grandi cellule B. Rispetto al gruppo di controllo, gli autori hanno osservato una maggiore abbondanza di Proteobacteria a livello di phylum, nonché di Escherichia coli e Clostridium butyricum (C. butyricum) a livello di specie. Varie analisi hanno suggerito che una maggiore prevalenza del phylum batterico Proteobacteria potrebbe fungere da potenziale marcatore per una comunità microbica instabile^{170,171} ed essere associata alla differenziazione delle cellule B¹⁶⁹. A differenza della maggior parte dei microbi, che sono anaerobi stretti, i Proteobacteria sono spesso anaerobi facoltativi o obbligati, il che consente loro di tollerare un'ampia gamma di condizioni tossiche. D'altro canto, l'E. coli produce colibactina e tossine citotattiche, che sono state associate a rotture del DNA nelle cellule epiteliali, promuovendo mutazioni genetiche e contribuendo alla formazione di tumori. L'E. coli svolge un ruolo cruciale anche nei processi linfoproliferativi e nelle infezioni colonizzando principalmente lo strato. C. butyricum, un batterio che produce butirato e acetato, è stato studiato per il suo potenziale uso terapeutico nelle malattie correlate alla disbiosi¹⁷².

5 STUDIO ONCOPASSPORT: DISEGNO DI NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI PERSONALIZZATI PER IL LINFOMA NON HODGKIN B DIFFUSO A GRANDI CELLULE

Il linfoma non Hodgkin B diffuso a grandi cellule (*Diffuse Large B cell lymphoma*, DLBCL) è la forma più frequente di linfoma non-Hodgkin, con una sopravvivenza globale del 30-50% a 5 anni. Il 60% dei pazienti rimane libero da malattia dopo la prima linea di immunochemioterapia standard costituita da R-CHOP (rituximab, ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone), tuttavia il 20-25% ricade dopo la risposta iniziale entro due anni dalla fine della terapia. Risulta quindi evidente come siano necessarie strategie innovative volte a migliorare e mantenere la risposta alla prima linea. Per questo la comprensione della variabilità di risposta dai pazienti con stessa patologia e sottoposti a stesso trattamento è un punto chiave allo scopo di identificare strategie che possano potenziare l'efficacia dei farmaci antitumorali e migliorare la predizione degli *outcomes* dei pazienti.

Recenti ricerche sul ruolo del microbiota intestinale (*Gut Microbiota*, GM) in ambito tumorale hanno evidenziato come possa influenzare il decorso della terapia attraverso meccanismi diretti (biotrasformazione del farmaco) e indiretti (modulando il metabolismo dell'ospite e le funzioni immunologiche).

Il microbiota umano è parte attiva della fisiologia umana, con un ruolo di primaria importanza nella regolazione delle nostre funzioni metaboliche e immunitarie; è un ecosistema plastico che può riorganizzare funzionalità e composizione in risposta a fattori ambientali.

Anche se preliminari, i dati indicano un possibile impatto della terapia con R-CHOP sulla struttura mutualistica del GM dell'ospite. Obiettivo primario della ricerca è la caratterizzazione longitudinale del microbiota intestinale dei pazienti affetti da DLBCL trattati con R-CHOP (pre, durante e post terapia) al fine di individuare le caratteristiche del GM che prevedono l'esito terapeutico, oltre a caratterizzare le modifiche compositive e funzionali del GM durante i due anni di follow-up. Se possibile si intendono formulare approcci innovativi per la stratificazione dei pazienti. Infine, una prospettiva futura è la creazione di linee guida per la modificazione del microbiota pre- e durante terapia per migliorare la risposta al trattamento e/o diminuirne la tossicità.

3.1 Pazienti e metodi

3.1.1 Disegno dello studio

Si tratta di uno studio multicentrico prospettico osservazionale condotto a partire dall'Aprile 2019, presso l'Istituto di Ematologia L. e A Seragnoli e l'istituto IRCSS Istituto Tumori della Romagna, volto ad analizzare il ruolo del microbiota intestinale in pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin diffuso a grandi cellule B di nuova diagnosi, candidati a terapia di prima linea secondo schema R-CHOP.

Lo studio ha ricevuto l'approvazione dal comitato etico CEAVEC di Bologna e tutti i partecipanti hanno fornito consenso informato in accordo con la Dichiarazione di Helsinki.

Lo studio prevedeva l'arruolamento di 50 pazienti affetti da linfoma non Hodgkin B diffuso a grandi cellule candidati a prima linea di terapia secondo schema R-CHOP. I pazienti dovevano rispettare i seguenti criteri di inclusione/esclusione:

- Criteri di inclusione: età ≥ 18 anni, nuova diagnosi di DLBCL istologicamente confermata, pazienti candidati alla terapia con R-CHOP, la COO è stata valutata in immunoistochimica
- Criteri di esclusione: concomitante neoplasia, o storia di neoplasia pregressa nei precedenti 5 anni, donne in gravidanza o allattamento, presenza di patologie mediche o psichiatriche gravi, acute o croniche che possano condizionare l'interpretazione dei risultati o interferire con gli stessi.

I pazienti sono stati valutati all'esordio secondo i criteri di Ann Arbor. TC collo torace addome, FDG-PET e biopsia osteomidollare sono state eseguite in tutti i pazienti, salvo controindicazioni cliniche.

La rivalutazione di malattia è stata eseguita dopo 3 cicli di trattamento e al termine. La rivalutazione ad interim è stata eseguita mediante FDG-PET, mentre alla rivalutazione finale sono state seguite nuovamente TC, FDG-PET e biopsia midollare se positiva all'esordio di malattia.

In corso di chemio-immunoterapia tutti i pazienti hanno ricevuto profilassi antibiotica con Trimetopim-Sulfametossazolo contro l'infezione da *Pneumocystis jiroveci*

Le indagini riguardanti la composizione del GM, sullo stile di vita e sulla dieta dei pazienti sono state condotte in modo continuo, seguendo i pazienti per tutta la durata del trattamento. Durante la fase di screening (entro 7 giorni prima dell'inizio della terapia) i pazienti sono stati sottoposti a valutazione tramite questionari validati sulle abitudini alimentari e sull'attività fisica e alla raccolta del primo campione di feci (pre-trattamento).

In corso di trattamento i campioni di feci sono stati raccolti prima dell'inizio di ognuno dei sei cicli di terapia contestualmente alla compilazione di questionari riguardo lo stile di vita e le abitudini alimentari. In caso di tossicità gastrointestinale e/o disordini immunologici di grado >2 e di tossicità ematologica di grado ≥ 3 è stato raccolto un campione di feci aggiuntivo.

Al termine del trattamento i campioni e i questionari sono stati raccolti in corrispondenza con la rivalutazione della patologia ematologica e, in caso di ottenimento e mantenimento di una remissione completa, ogni 6 mesi per i successivi 2 anni di follow-up.

Nel caso di recidiva di malattia entro i due anni, i pazienti eseguivano un'ultima raccolta di campione fecale e uscivano dallo studio.

3.1.2 Obiettivi dello studio

Obiettivo primario dello studio era la caratterizzazione longitudinale del microbiota intestinale pre, durante e post terapia per individuare le caratteristiche del GM che possano prevedere la risposta al trattamento.

Gli **Obiettivi Secondari** ed esplorativi erano:

- Caratterizzazione delle modificazioni compositive e funzionali del GM durante i due anni di follow-up;
- Sviluppo di approcci innovativi per la stratificazione dei pazienti;
- Progettazione di nuove terapie integrate personalizzate basate su R-CHOP che, anche mirando all'ecosistema microbico intestinale, consentiranno il miglioramento dei risultati terapeutici del DLBCL;
- Progettazione di uno stile di vita personalizzato e di raccomandazioni dietetiche per migliorare l'esito a lungo termine nei pazienti con DLBCL dopo RCHOP di prima linea.

5.1.1 Analisi del microbiota intestinale

Le indagini sui campioni di feci sono state condotte presso il Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (Chimica e Biotecnologia delle Fermentazioni) dell'Università di Bologna (responsabile Prof.ssa Patrizia Brigidi).

I campioni fecali raccolti sono stati sottoposti ad estrazione del DNA batterico mediante il kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN) e la concentrazione finale del DNA è stata determinata usando lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000.

Inoltre, è stata eseguita la caratterizzazione filogenetica del GM mediante amplificazione delle regioni ipervariabili V3 e V4 del gene batterico codificante il 16S rRNA seguendo il protocollo Illumina per la preparazione delle librerie. Le sequenze ottenute sono state analizzate attraverso il software open source Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME), sono state raggruppate sulla base dell'identità al 97% in Operational Taxonomic Units (OTUs) e quindi assegnate ad un taxon batterico.

5.1.2 Metodi statistici

Gli *endpoint* di sopravvivenza considerati nello studio sono la sopravvivenza globale (overall survival, OS), la sopravvivenza libera da progressione (progression free survival, PFS) e la sopravvivenza libera da malattia (disease free survival, DFS). La sopravvivenza globale si definisce come il periodo che intercorre tra l'inizio della terapia ed il decesso avvenuto per qualsiasi causa. La sopravvivenza libera da progressione si definisce come il periodo che intercorre dall'inizio della terapia fino a progressione/ricaduta di malattia, o decesso per qualsiasi causa. La sopravvivenza libera da malattia si definisce come il periodo che intercorre da quando il paziente raggiunge lo stato di remissione completa (RC) fino alla ricaduta, al decesso legato alla malattia o a tossicità acuta correlata al trattamento.

Le caratteristiche demografiche dei pazienti sono riportate come statistiche descrittive e le curve di sopravvivenza sono tracciate secondo il metodo di Kaplan-Meier.

Il tasso di risposta globale (overall response rate, ORR) è definito come la percentuale di pazienti, relativa al totale dei soggetti arruolati, che ottengono una risposta completa o parziale.

Gli eventi avversi e gli eventi avversi gravi sono stati valutati nella loro incidenza e la gravità è definita in base ai Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE v.5.0) del National Cancer Institute.

La diversità della composizione del microbiota intestinale è stata studiata sviluppando curve di rarefazione di α -diversity, che misura l'abbondanza degli OTU (*operational taxonomic unit*) in relazione ad altri nello stesso campione, utilizzando diverse metriche. La diversità interindividuale nella composizione del microbiota intestinale (β -diversity) è stata invece valutata mediante distanze UniFrac pesate e non, utilizzate successivamente per l'analisi delle coordinate principali (PCoA). Il test di Fisher è stato utilizzato per valutare la significatività delle differenze tra i cluster. Il test Wilcoxon signed-rank t è stato utilizzato per confrontare α - e β -diversity.

5.2 RISULTATI

5.2.1 Caratteristiche dei pazienti

Da Aprile 2019 a ottobre 2021 sono stati arruolati consecutivamente 50 pazienti di cui 45 hanno consegnato almeno un campione di feci e costituiscono il campione finale dello studio valido per le analisi.

Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte nella tabella 3. I pazienti arruolati erano per il 57.8% maschi e per il 42.2% femmine. L'età mediana all'arruolamento è stata di 63,7 anni (range, 20-84 anni). Alla diagnosi il 75,6% dei pazienti aveva un ECOG di 0 e l'82,2% non presentava sintomi. Inoltre, la maggioranza dei pazienti (66,7%) presentava una malattia in stadio avanzato, III-IV secondo Ann Arbor. Per quanto riguarda la stratificazione in sottotipi il 44,4% erano GCB-Like, il 37.8% non GCB o ABC e un 17.8% non specificato (Tabella 1).

<u>Sesso</u>	N (%)
Maschi	26 (57,8)
Femmine	19 (42,2)
	Età (range)
<u>Età mediana al reclutamento, anni</u>	63,8 (20-84)
<u>Età mediana alla diagnosi, anni</u>	63,6 (20-84)
<u>Stadio alla diagnosi</u>	N (%)
I	7 (15,5)
II	8 (17,8)
III	5 (11,1)
IV	25 (55,6)

<u>Sintomi alla diagnosi</u>	N (%)
SI	8 (17,8)
No	37 (82,2)
<u>ECOG, performance status</u>	N (%)
0	34 (75,6)
1	9 (20,0)
2	2 (4,4)
<u>Istologia</u>	N (%)
NOS	8 (17,8)
GCB	20 (44,4)
ABC	5 (11,1)
non GCB	12 (26,7)

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti

5.2.2 Efficacia

La valutazione della risposta al trattamento è stata eseguita dopo tre cicli R-CHOP, al termine dei sei cicli e al termine dello studio. Per quanto riguarda la valutazione ad interim questa era presente in 41 pazienti con un ORR del 91.1%, in particolare un tasso di RC pari al 71.1%, di RP del 20% ed un unico paziente con stabilità di malattia (SD). Quarantaquattro pazienti sono invece stati sottoposti a rivalutazione finale (post 6° ciclo). Il tasso di ORR è stato pari al 91,1% con un RC nell'80% dei pazienti (36/45), di cui quattro hanno convertito la RP ad interim, mentre l'11,1% (4/45) ha mantenuto una remissione parziale. Nel corso dello studio la miglior risposta ottenuta è stata la remissione completa nell'84.4% dei casi. Al termine dello studio 4 pazienti erano andati incontro a progressione di malattia e 2 a decesso (Tabella 2).

ESITI DEL TRATTAMENTO	
<u>Valutazione ad interim</u>	N (%)
Stabilità	1 (2,2)
Risposta parziale	9 (20,0)
Risposta completa	32 (71,1)
NA	3 (6,7)
ORR, %	91,1%
<u>VALUTAZIONE FINALE</u>	N (%)
Progressione	3 (6,7)
Risposta parziale	5 (11,1)
Risposta completa	36 (80,0)
NA	1 (2,2)
ORR, %	91,1%
<u>VALUTAZIONE TERMINE STUDIO</u>	N (%)
Decesso	2 (4,4)

Progressione di malattia	4 (8,9)
Scelta del paziente	3 (6,7)
Scelta del medico	3 (6,7)
Trattamento completato secondo il protocollo	2 (4,4)
Follow-up completato secondo il protocollo	24 (40,0)
NA	12 (28,9)
Best Response	N (%)
Risposta parziale	7 (15,6)
Risposta completa	38 (84,4)

Tabella 2. Risposte al trattamento

5.2.3 Eventi avversi

Gli eventi avversi sono stati definiti in base ai *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (NCI-CTCAE v.5.0) del *National Cancer Institute*. Le tossicità sono state suddivise in ematologiche, non-ematologiche e, vista la peculiarità dello studio, fra quest'ultime sono state individuate tutte le tossicità gastrointestinali.

Trentatré pazienti su 45 hanno sviluppato almeno una tossicità ematologica durante il trattamento, di cui la neutropenia è stata la più frequente (70%), presentandosi nel 62.5% dei casi come di grado 3-4.

Quarantatré pazienti hanno sviluppato almeno una tossicità extra-ematologica, di cui le più frequenti sono state l'iperpiressia di grado 1-2 (10,8%) e la neuropatia periferica di grado 1-2 (11,5%). Ventisette pazienti hanno sviluppato tossicità gastrointestinali, principalmente di grado 1-2. Gli eventi avversi GI più frequenti sono stati la stipsi (15,3%), la mucosite del cavo orale (15,3%) e la nausea (12,9%). Solo in due casi è stato riportato un evento avverso di grado superiore a 2 (epigastralgia e occlusione colica) (Tabella 3).

EVENTI AVVERSI	N	Tutti i gradi
Ematologici	80	
Emoglobina bassa		18
Leucocitosi neutrofila		1
Leucopenia		2
Neutropenia		56
Neutropenia febbrile		3
GASTROINTESTINALI	85	
Afte orali		1
Bruciore di stomaco		1
Candidosi orale		1

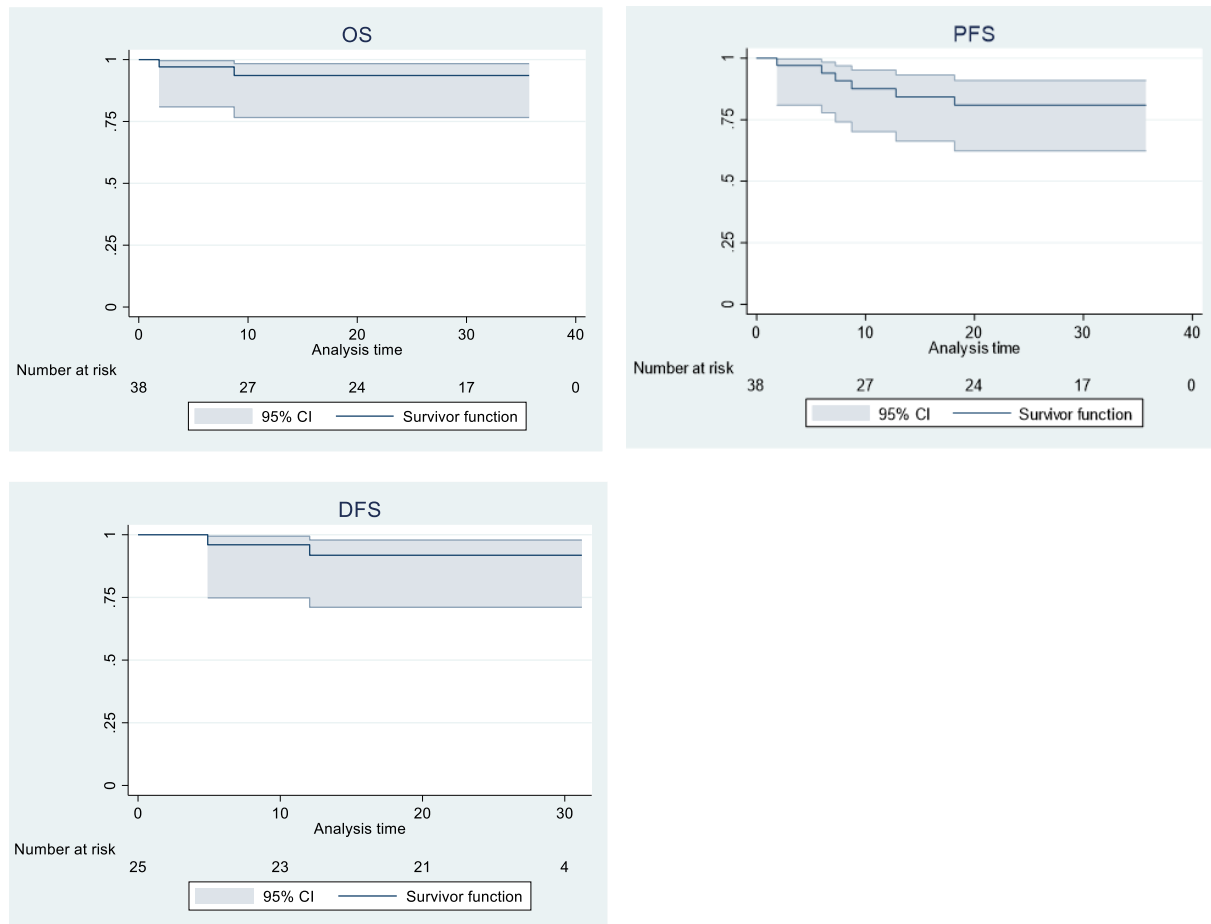
Disfagia		1
Disgeusia		4
Dissenteria		8
Dolore allo stomaco		1
Dolore del cavo orale		1
Edema orale		1
Epigastralgia (dolore addominale)		8
Ernia iatale		1
Meteorismo		5
Mucosite orale		13
Nausea		11
Ostruzione del colon		1
Perdita di peso		1
Polipo infiammatorio		1
Reflusso gastro-esofageo con bruciore retrosternale		1
Sangue nelle feci		9
Stipsi		13
Vomito		2
Extra-ematologici	157	
Alopecia		4
Anoressia		1
Astenia		6
Bruciore		1
Cefalea		10
Disfonia		4
Disturbi cardiaci		11
Disturbi del tratto respiratorio		9
Disturbi del tratto urinario		10
Dolore		13
Edema degli arti inferiori		1
Evento tromboembolico		4
Febbre		17
Fratture ossee		2
Herpes labiale		1
Innalzamento dei livelli di GGT		1
Innalzamento delle transaminasi		2
Insonnia		1
Ipercolesterolemia		1
Ipercreatininemia		6
Iperglicemia		3
Ipocalcemia		1
Ipopotassemia		1
Ipotensione		6
Ipovisus		1
Lesione purpurica		1
Mancanza di folati		1
Neuropatia periferica		18
Paronichia degli alluci		1
Pielonefrite bilaterale multifocale		1
Rash		13
Rialzo pressorio		1
Tremore		2

Vertigini		1
Vulvovaginite acuta		1

Tabella 3. Eventi avversi

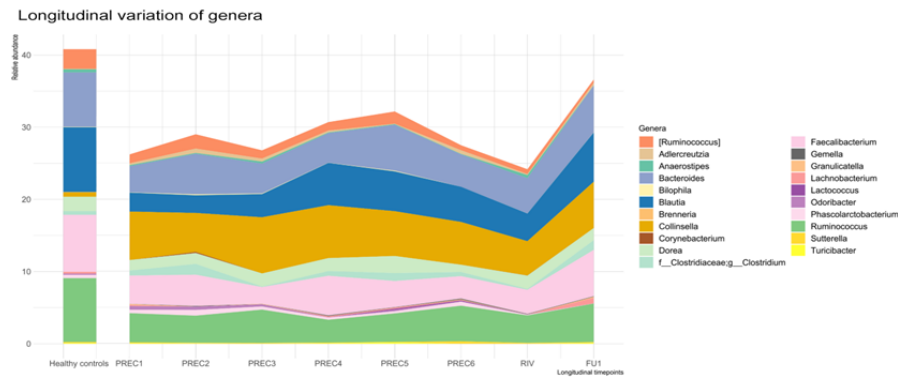
5.2.4 Analisi di sopravvivenza

Le analisi di sopravvivenza eseguiti hanno incluso gli andamenti di OS, PFS e DFS. L'OS è risultata del 94% con un follow-up mediano di 35 mesi (Figura 8), la PFS del 81% (Figura 9), e la DFS del 91% a 31 mesi (Figura 10).



5.2.5 Risultati analisi microbiota

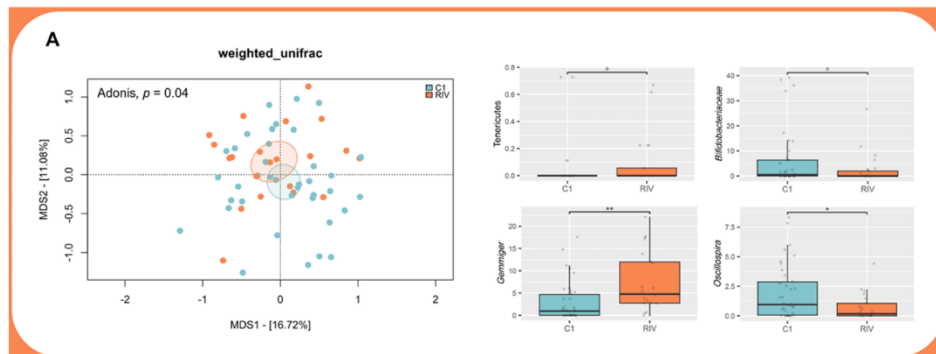
L'analisi del microbiota intestinale nei pazienti con DLBCL ha mostrato una alterazione della normale composizione già prima dell'inizio del trattamento. In particolare, presentavano una minore varietà e una composizione disbiotica. Questa alterazione si è mantenuta fino al quarto ciclo di trattamento al quale è seguita una globale contrazione della popolazione batterica con



parziale ripristino di un microbiota sano dopo circa sei mesi dal termine della terapia (Figura 11).

Sono state eseguite analisi al fine di valutare le differenze del microbiota pre e post trattamento, nei pazienti che hanno manifestato eventi avversi e fra i pazienti con malattia e un gruppo di controllo. Di seguito nel dettaglio l'esito di tali analisi.

Il confronto fra il microbiota dei pazienti al *baseline* e all'EOT ha evidenziato una β diversità statisticamente significativa ($p = 0,04$) ai due *time points*. Nel dettaglio alla fine del trattamento, c'è stato un aumento del phylum Tenericutes e del genere Gemmiger rispetto al basale con una riduzione della famiglia delle Bifidobacteriaceae e del genere Oscillospira (Figura 12).



Successivamente è stato studiato il microbiota nei pazienti che hanno manifestato eventi avversi in corso di trattamento vs i pazienti che non hanno manifestato tossicità con riscontro di una differenza statisticamente significativa ($p=0,0045$) in β diversità. Particolare attenzione è stata rivolta ai pazienti che hanno manifestato tossicità gastrointestinale e neutropenia febbrile. I pazienti che avevano manifestato eventi avversi presentano un aumento del phylum Bacteroidetes, della famiglia Porphyromonadaceae e dei generi Butyrivibrio e

Paraprevotella e al contempo una riduzione degli Actinobacteria, delle famiglie Peptostreptococcaceae e Bifidobacteriaceae e dei generi Dorea e Coprobacillus (Figura 13).

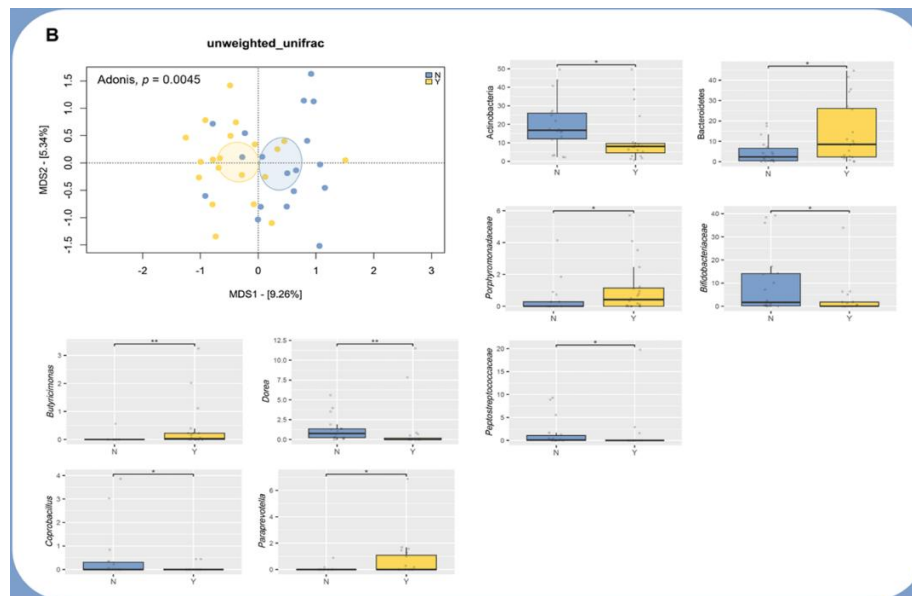


Figura 13. diversità β e boxplots dei pazienti al baseline che non hanno manifestato eventi avversi (N) e dei pazienti che hanno sviluppato eventi avversi (Y)

Infine è stato eseguito un confronto fra microbiota dei pazienti, sia al baseline che al termine del trattamento (EOT, *end of treatment*), con quello di una popolazione sana di controllo con caratteristiche simili e comparabili. I dati hanno evidenziato delle differenze statisticamente significative in termini di beta diversità ad entrambi i *time point*. Si segnala, nella popolazione affetta DLBCL, un incremento dei batteri appartenenti al phylum Proteobacteria e della famiglia delle Enterobacteriaceae (Figura 14).

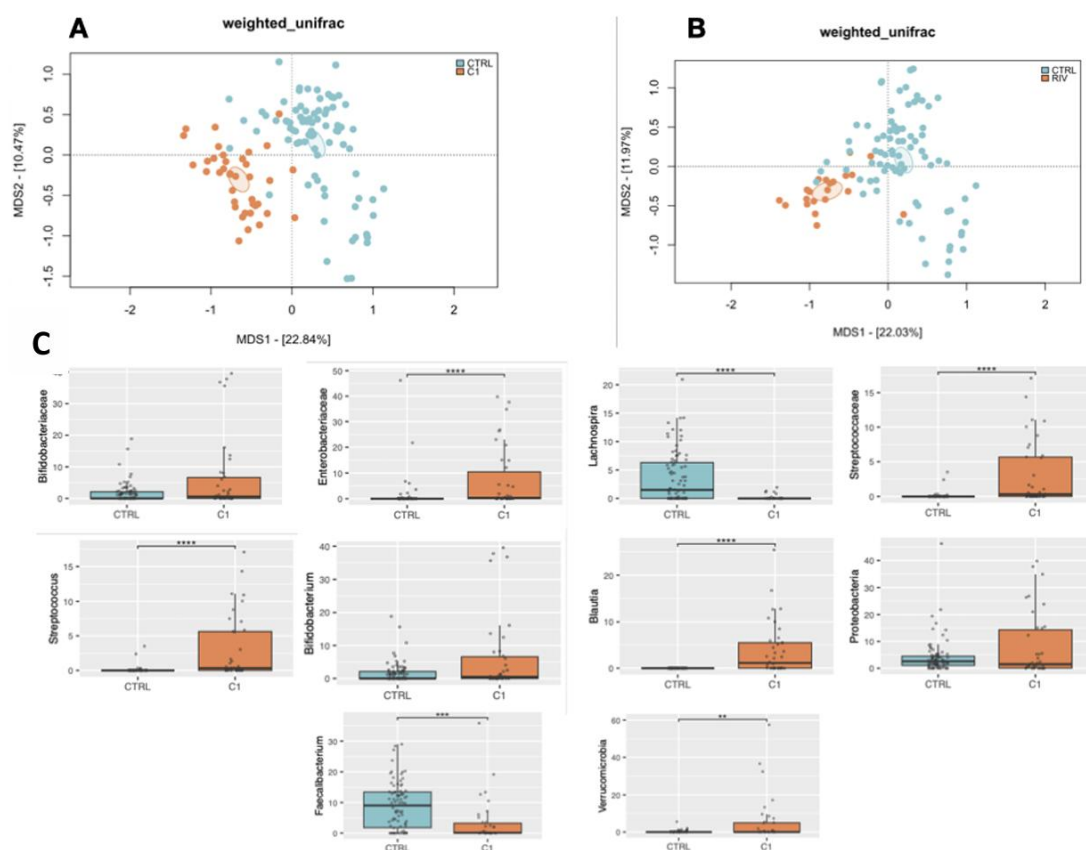


Figura 14. Profilo del microbiota intestinale. A: PCoA basato sulle distanze UniFrac uniwighted per la valutazione della diversità β tra i pazienti al baseline (C1) e il gruppo di controllo (CTRL) B: diversità β tra i pazienti all'end of treatment (RIV) e il gruppo di controllo (CTRL). C: Boxplots relativi alle differenze tra i phylum, famiglia e genere dei due gruppi

6 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La presenza di disbiosi del microbiota intestinale è stata osservata in numerosi studi sul linfoma. Yoon e colleghi hanno descritto i pazienti con diagnosi di linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) mostrano una diversità α significativamente ridotta rispetto ai soggetti sani, insieme a un marcato aumento dell'abbondanza di batteri della famiglia delle Enterobacteriaceae rispetto a quelli osservati nei controlli sani¹⁷³. Una ricerca ha rilevato che la somministrazione di antibiotici ad ampio spettro prima del trattamento con cellule T bersaglio del recettore dell'antigene chimerico CD19 (CAR-T) ha prodotto esiti sfavorevoli¹⁷⁴. Nel contesto del trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (HSCT) in pazienti con linfoma, la ricerca ha rivelato una correlazione tra la proliferazione delle specie *Lactobacillus* con l'esacerbazione o il peggioramento della malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD)¹⁷⁵.

La maggior parte degli studi condotti è limitato nello stabilire una relazione causale definitiva tra l'esposizione e l'esito in esame. Inoltre i potenziali fattori confondenti sono numerosi. Tuttavia cercare di stabilire connessioni causali migliorerebbe la nostra comprensione del ruolo del microbiota intestinale nella patogenesi del linfoma e avrebbe il potenziale di guidare interventi personalizzati basati sul microbiota.

Fra gli studi condotti negli ultimi anni tre sono fondamentali allo scopo di interpretare e confrontare i dati da noi ottenuti.

Il primo studio che prenderemo in esame è stato pubblicato nel 2021 da Yuan et al¹⁶⁹ ed ha coinvolto 25 pazienti affetti da DLBCL all'esordio e 26 controlli sani (CG, *control group*). I pazienti erano suddivisi secondo il sottotipo di COO: GCB (14 casi, 58,3%) o ABC (10 casi, 41,7%). L'età media del CG era di 56 anni con 14 (53,8%) uomini e 12 (46,2%) donne. Non c'era alcuna differenza significativa di età e sesso tra EG e CG. Sono stati analizzati mediante sequenziamento del gene 16S rRNA un totale di 51 campioni fecali. Nell'analisi della diversità α , non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nella diversità e nell'abbondanza delle specie tra i due gruppi. Tuttavia, è stata osservata una differenza significativa nell'analisi della diversità β . Il microbiota intestinale nei pazienti con DLBCL ha mostrato una relazione evolutiva continua, che è progredita dal phylum, proteobacteria, al genere, *Escherichia-Shigella*. La loro abbondanza era significativamente più alta di quella del gruppo di controllo. A livello di genere, *Allisonella*, *lachnospira* e *Roseburia* erano più abbondanti nei pazienti con DLBCL rispetto al gruppo di controllo. La previsione funzionale tramite PICRUST ha indicato che il metabolismo della tiamina e la biosintesi di fenilalanina, tirosina e triptofano erano significativamente più bassi nel gruppo DLBCL rispetto al gruppo di controllo.

Il secondo studio condotto da Lin et al.¹⁷⁶ ha analizzato 35 pazienti affetti da DLBCL all'esordio e 20 controlli sani (HC, *health control*). Anche in questo caso non sono state riscontrate differenze nella alfa diversità, mentre la diversità beta era significativamente diminuita. Il Proteobacteria era dominante nel DLBCL, mentre la presenza di Bacteroidetes era significativamente diminuita rispetto agli HC.

Infine, il terzo studio condotto da Yoon et al.¹⁷⁷, pubblicato nel 2023, ha valutato 199 pazienti, sempre considerando DLBCL all'esordio. Un primo sequenziamento è stato eseguito su 158 pazienti e successivamente il sequenziamento *shotgun* dell'intero genoma su campioni aggiuntivi, pari a 106. Sono stati confrontati i dati del microbioma dei pazienti con i dati dei controlli sani. In questo studio, a differenza dei due precedenti, è emersa una diversità alfa significativamente inferiore nei pazienti con DLBCL rispetto ai controlli sani. Nei pazienti è stata riscontrata un'abbondanza della famiglia Enterobacteriaceae appartenente al phylum Proteobacteria rispetto ai controlli sani. I membri delle Enterobacteriaceae erano significativamente arricchiti nei pazienti che avevano manifestato neutropenia febbrile e in quelli che avevano manifestato recidiva o progressione. Questa abbondanza di Enterobacteriaceae correlava anche a una PFS più breve. I profili citochinici dei pazienti il cui microbioma era arricchito con Enterobacteriaceae erano significativamente associati ai livelli di interleuchina 6 e interferone gamma.

I dati da noi raccolti confermano la presenza di un profilo pro infiammatorio nei pazienti affetti da DLBCL all'esordio rispetto al gruppo di controllo. Nei pazienti affetti da DLBCL, al baseline e all'EOT, è stata riscontrata un'abbondanza superiore di Proteobacteria e delle famiglie Enterobacteriaceae e Streptococcaceae rispetto ai controlli. Sia nel lavoro di Ling et al che di Sang et al veniva descritta un'abbondanza di proteobacteria nei pazienti affetti dalla patologia ematologica rispetto al gruppo di controllo. I nostri risultati sono inoltre concordi con quando descritto da Sang et al in merito alla maggior presenza di Enterobacteriaceae, se nello studio pubblicato nel 2023 questa famiglia sembra essere associata allo sviluppo di neutropenia febbrile e ad un peggiore *outcome* nel nostro lavoro questo non è emerso. Tuttavia è necessario considerare che la scarsa numerosità del campione non consente valutazioni di confronto statisticamente adeguate. Come presentato precedentemente l'assunzione di una terapia antibiotica può influenzare la composizione del microbiota intestinale. Al momento non abbiamo dati relativi alla nostra popolazione in merito ad eventuali correlazioni fra le terapie antibiotiche svolte in corso di trattamento ed eventuali modifiche del microbiota intestinale. Esplorare tale aspetto potrà essere utile al fine di distinguere le modifiche indotte dalla chemioterapia stessa sulla popolazione microbica da quelle indotte dalle frequenti terapie antimicrobiche di accompagnamento.

La relazione tra microbiota e neoplasia ematologica è complessa e influenzata da vari fattori; tuttavia, sembra ormai evidente come la struttura del microbioma nel DLBCL sia influenzato e influenzi a sua volta la malattia, lo stato di sorveglianza immunitaria del paziente, la risposta alla terapia e gli effetti collaterali. Comprendere questi fattori e il loro impatto sarà fondamentale per lo sviluppo di strategie terapeutiche personalizzate. Sono tuttavia necessari ulteriori studi per chiarire l'origine e il ruolo della disbiosi intestinale nella DLBCL e per concretizzare la possibilità di intervenire sul microbiota con l'obiettivo di migliorare i tassi di risposta al trattamento e aumentare i tassi di sopravvivenza dei pazienti.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2006;107(1):265-276. doi:10.1182/BLOOD-2005-06-2508
2. Sant M, Allemani C, Tereanu C, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010;116(19):3724-3734. doi:10.1182/BLOOD-2010-05-282632
3. Shirley MH, Sayeed S, Barnes I, Finlayson A, Ali R. Incidence of haematological malignancies by ethnic group in England, 2001-7. *Br J Haematol*. 2013;163(4):465-477. doi:10.1111/BJH.12562
4. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*. 2011;105(11):1684-1692. doi:10.1038/BJC.2011.450
5. Cerhan JR, Berndt SI, Vijai J, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for diffuse large B cell lymphoma. *Nat Genet*. 2014;46(11):1233-1238. doi:10.1038/NG.3105
6. Cerhan JR, Krickler A, Paltiel O, et al. Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for diffuse large B-cell lymphoma: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2014;2014(48):15-25. doi:10.1093/JNCIMONOGRAPHS/LGU010
7. Yamaguchi M, Seto M, Okamoto M, et al. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood*. 2002;99(3):815-821. doi:10.1182/BLOOD.V99.3.815
8. Slack GW, Steidl C, Sehn LH, Gascoyne RD. CD30 expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study from British Columbia. *Br J Haematol*. 2014;167(5):608-617. doi:10.1111/BJH.13085
9. Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A, et al. CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2013;121(14):2715-2724. doi:10.1182/BLOOD-2012-10-461848
10. Sanchez E, Chacon I, Plaza MM, et al. Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J Clin Oncol*. 1998;16(5):1931-1939. doi:10.1200/JCO.1998.16.5.1931
11. Kramer MH, Hermans J, Parker J, et al. Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol*. 1996;14(7):2131-2138. doi:10.1200/JCO.1996.14.7.2131
12. Tang SC, Visser L, Hepperle B, Hanson J, Poppema S. Clinical significance of bcl-2-MBR gene rearrangement and protein expression in diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma: An analysis of 83 cases. *Journal of Clinical Oncology*. 1994;12(1):149-154. doi:10.1200/JCO.1994.12.1.149
13. Riedell PA, Smith SM. Double hit and double expressors in lymphoma: Definition and treatment. *Cancer*. 2018;124(24):4622-4632. doi:10.1002/CNCR.31646

14. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1720-1748. doi:10.1038/S41375-022-01620-2
15. Alizadeh AA, Elsen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-511. doi:10.1038/35000501
16. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(25):1937-1947. doi:10.1056/NEJMOA012914
17. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. The genetic landscape of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol*. 2015;52(2):67-76. doi:10.1053/J.SEMINHEMATOL.2015.01.005
18. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-282. doi:10.1182/BLOOD-2003-05-1545
19. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-282. doi:10.1182/BLOOD-2003-05-1545
20. Scott DW, King RL, Staiger AM, et al. High-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with diffuse large B-cell lymphoma morphology. *Blood*. 2018;131(18):2060-2064. doi:10.1182/BLOOD-2017-12-820605
21. Rosenwald A, Bens S, Advani R, et al. Prognostic Significance of MYC Rearrangement and Translocation Partner in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Study by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol*. 2019;37(35):3359-3368. doi:10.1200/JCO.19.00743
22. Cheson BD, Ansell S, Schwartz L, et al. Refinement of the Lugano Classification lymphoma response criteria in the era of immunomodulatory therapy. *Blood*. 2016;128(21):2489-2496. doi:10.1182/blood-2016-05-718528
23. Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, et al. Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: Consensus of the international conference on malignant lymphomas imaging working group. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(27):3048-3058. doi:10.1200/JCO.2013.53.5229
24. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3059-3067. doi:10.1200/JCO.2013.54.8800
25. Cheson BD. Role of functional imaging in the management of lymphoma. *J Clin Oncol*. 2011;29(14):1844-1854. doi:10.1200/JCO.2010.32.5225
26. Vercellino L, Cottareau AS, Casasnovas O, et al. High total metabolic tumor volume at baseline predicts survival independent of response to therapy. *Blood*. 2020;135(16):1396-1405. doi:10.1182/BLOOD.2019003526
27. Rutherford SC, Herold M, Hiddemann W, et al. Impact of bone marrow biopsy on response assessment in immunochemotherapy-treated lymphoma patients in GALLIUM and GOYA. *Blood Adv*. 2020;4(8):1589-1593. doi:10.1182/BLOODADVANCES.2019001261

28. Casasnovas RO, Meignan M, Berriolo-Riedinger A, et al. SUVmax reduction improves early prognosis value of interim positron emission tomography scans in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2011;118(1):37-43. doi:10.1182/BLOOD-2010-12-327767
29. Maurer MJ, Ghesquières H, Jais JP, et al. Event-free survival at 24 months is a robust end point for disease-related outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *J Clin Oncol*. 2014;32(10):1066-1073. doi:10.1200/JCO.2013.51.5866
30. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1993;329(14):987-994. doi:10.1056/NEJM199309303291402
31. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, et al. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2373-2380. doi:10.1200/JCO.2009.26.2493
32. Bari A, Marcheselli L, Sacchi S, et al. Prognostic models for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: a never-ending story. *Ann Oncol*. 2010;21(7):1486-1491. doi:10.1093/ANNONC/MDP531
33. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007;109(5):1857-1861. doi:10.1182/BLOOD-2006-08-038257
34. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*. 2014;123(6):837-842. doi:10.1182/BLOOD-2013-09-524108
35. Zhang J, Chen B, Xu X. Impact of rituximab on incidence of and risk factors for central nervous system relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(3):509-514. doi:10.3109/10428194.2013.811239
36. Bokstein F, Lossos A, Lossos IS, Siegal T. Central nervous system relapse of systemic non-Hodgkin's lymphoma: results of treatment based on high-dose methotrexate combination chemotherapy. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(3):587-593. doi:10.1080/10428190290012092
37. Bernstein SH, Unger JM, LeBlanc M, Friedberg J, Miller TP, Fisher RI. Natural history of CNS relapse in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma: a 20-year follow-up analysis of SWOG 8516 -- the Southwest Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2009;27(1):114-119. doi:10.1200/JCO.2008.16.8021
38. Schmitz N, Zeynalova S, Nickelsen M, et al. CNS International Prognostic Index: A risk model for CNS relapse in patients with diffuse large B-Cell lymphoma treated with R-CHOP. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(26):3150-3156. doi:10.1200/JCO.2015.65.6520/ASSET/AF767F86-133B-404D-9C77-514B6F85DB44/ASSETS/IMAGES/LARGE/JCO656520TA3.JPG
39. Coiffier B, Lepage E, Brière J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(4):235-242. doi:10.1056/NEJM0A011795
40. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, et al. Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol*. 2008;9(2):105-116. doi:10.1016/S1470-2045(08)70002-0

41. Récher C, Coiffier B, Haioun C, et al. Intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab versus standard CHOP plus rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (LNHO3-2B): an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2011;378(9806):1858-1867. doi:10.1016/S0140-6736(11)61040-4
42. Tilly H, Morschhauser F, Sehn LH, et al. Polatuzumab Vedotin in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2022;386(4):351-363. doi:10.1056/NEJMOA2115304
43. Sehn L, Congiu A, Culligan D, Blood MG, 2018 undefined. No added benefit of eight versus six cycles of CHOP when combined with rituximab in previously untreated diffuse large B-cell lymphoma patients: results. *ElsevierLH Sehn, AG Congiu, DJ Culligan, M Gironella, DH Yoon, M Ogura, A Rosta, J ZhuBlood, 2018•Elsevier*. Accessed October 14, 2024. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497119368326>
44. Vitolo U, Trneny M, Belada D, et al. Obinutuzumab or Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2017;35(31):3529-3537. doi:10.1200/JCO.2017.73.3402
45. Leonard JP, Kolibaba KS, Reeves JA, et al. Randomized Phase II Study of R-CHOP With or Without Bortezomib in Previously Untreated Patients With Non-Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2017;35(31):3538-3546. doi:10.1200/JCO.2017.73.2784
46. Davies A, Cummin TE, Barrans S, et al. Gene-expression profiling of bortezomib added to standard chemoimmunotherapy for diffuse large B-cell lymphoma (REMoDL-B): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(5):649-662. doi:10.1016/S1470-2045(18)30935-5
47. Younes A, Sehn LH, Johnson P, et al. Randomized Phase III Trial of Ibrutinib and Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Non-Germinal Center B-Cell Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2019;37(15):1285-1295. doi:10.1200/JCO.18.02403
48. Nowakowski GS, Hong F, Scott DW, et al. Addition of Lenalidomide to R-CHOP Improves Outcomes in Newly Diagnosed Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Randomized Phase II US Intergroup Study ECOG-ACRIN E1412. *J Clin Oncol*. 2021;39(12):1329-1338. doi:10.1200/JCO.20.01375
49. Nowakowski GS, Chiappella A, Gascoyne RD, et al. ROBUST: A Phase III Study of Lenalidomide Plus R-CHOP Versus Placebo Plus R-CHOP in Previously Untreated Patients With ABC-Type Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2021;39(12):1317-1328. doi:10.1200/JCO.20.01366
50. Crump M, Leppä S, Fayad L, et al. Randomized, Double-Blind, Phase III Trial of Enzastaurin Versus Placebo in Patients Achieving Remission After First-Line Therapy for High-Risk Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2016;34(21):2484-2492. doi:10.1200/JCO.2015.65.7171
51. Witzig TE, Tobinai K, Rigacci L, et al. Adjuvant everolimus in high-risk diffuse large B-cell lymphoma: final results from the PILLAR-2 randomized phase III trial. *Ann Oncol*. 2018;29(3):707-714. doi:10.1093/ANNONC/MDX764
52. Thieblemont C, Tilly H, Da Silva MG, et al. Lenalidomide Maintenance Compared With Placebo in Responding Elderly Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With First-Line

Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. *J Clin Oncol*. 2017;35(22):2473-2481. doi:10.1200/JCO.2017.72.6984

53. Witzig TE, Tobinai K, Rigacci L, et al. Adjuvant everolimus in high-risk diffuse large B-cell lymphoma: final results from the PILLAR-2 randomized phase III trial. *Ann Oncol*. 2018;29(3):707-714. doi:10.1093/ANNONC/MDX764
54. Crump M, Leppä S, Fayad L, et al. Randomized, Double-Blind, Phase III Trial of Enzastaurin Versus Placebo in Patients Achieving Remission After First-Line Therapy for High-Risk Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2016;34(21):2484-2492. doi:10.1200/JCO.2015.65.7171
55. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(19):3121-3127. doi:10.1200/JCO.2005.05.1003
56. Pregno P, Chiappella A, Bellò M, et al. Interim 18-FDG-PET/CT failed to predict the outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated at the diagnosis with rituximab-CHOP. *Blood*. 2012;119(9):2066-2073. doi:10.1182/BLOOD-2011-06-359943
57. Moskowitz CH, Schöder H, Teruya-Feldstein J, et al. Risk-adapted dose-dense immunochemotherapy determined by interim FDG-PET in Advanced-stage diffuse large B-Cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2010;28(11):1896-1903. doi:10.1200/JCO.2009.26.5942
58. Dührsen U, Müller S, Hertenstein B, et al. Positron Emission Tomography-Guided Therapy of Aggressive Non-Hodgkin Lymphomas (PETAL): A Multicenter, Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol*. 2018;36(20):2024-2034. doi:10.1200/JCO.2017.76.8093
59. Vitolo U, Trneny M, Belada D, et al. Obinutuzumab or Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2017;35(31):3529-3537. doi:10.1200/JCO.2017.73.3402
60. Freeman CL, Savage KJ, Villa DR, et al. Long-term results of PET-guided radiation in patients with advanced-stage diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2021;137(7):929-938. doi:10.1182/BLOOD.2020005846
61. Miller TP, Dahlberg S, Cassady JR, et al. Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1998;339(1):21-26. doi:10.1056/NEJM199807023390104
62. Stephens DM, Li H, LeBlanc ML, et al. Continued Risk of Relapse Independent of Treatment Modality in Limited-Stage Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Final and Long-Term Analysis of Southwest Oncology Group Study S8736. *J Clin Oncol*. 2016;34(25):2997-3004. doi:10.1200/JCO.2015.65.4582
63. Poeschel V, Held G, Ziepert M, et al. Four versus six cycles of CHOP chemotherapy in combination with six applications of rituximab in patients with aggressive B-cell lymphoma with favourable prognosis (FLYER): a randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet*. 2019;394(10216):2271-2281. doi:10.1016/S0140-6736(19)33008-9
64. Lamy T, Damaj G, Soubeyran P, et al. R-CHOP 14 with or without radiotherapy in nonbulky limited-stage diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2018;131(2):174-181. doi:10.1182/BLOOD-2017-07-793984
65. Persky DO, Li H, Stephens DM, et al. Positron Emission Tomography-Directed Therapy for Patients With Limited-Stage Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Results of Intergroup National

Clinical Trials Network Study S1001. *J Clin Oncol*. 2020;38(26):3003-3011.
doi:10.1200/JCO.20.00999

66. Sehn L, Scott D, Villa D, Gerrie A, Blood CF, 2019 undefined. Long-term follow-up of a PET-guided approach to treatment of limited-stage diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) in British Columbia (BC). *Elsevier* LH Sehn, DW Scott, D Villa, AS Gerrie, CL Freeman, CA Parsons, T Pickles, A Lo, P Farinha Blood, 2019•Elsevier. Accessed October 24, 2024.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497118583191>
67. Dale W, Klepin HD, Williams GR, et al. Practical Assessment and Management of Vulnerabilities in Older Patients Receiving Systemic Cancer Therapy: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2023;41(26):4293-4312. doi:10.1200/JCO.23.00933
68. Merli F, Luminari S, Tucci A, et al. Simplified Geriatric Assessment in Older Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma: The Prospective Elderly Project of the Fondazione Italiana Linfomi. *J Clin Oncol*. 2021;39(11):1214-1222. doi:10.1200/JCO.20.02465
69. Peyrade F, Jardin F, Thieblemont C, et al. Attenuated immunochemotherapy regimen (R-miniCHOP) in elderly patients older than 80 years with diffuse large B-cell lymphoma: a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(5):460-468. doi:10.1016/S1470-2045(11)70069-9
70. Fields PA, Townsend W, Webb A, et al. De novo treatment of diffuse large B-cell lymphoma with rituximab, cyclophosphamide, vincristine, gemcitabine, and prednisolone in patients with cardiac comorbidity: a United Kingdom National Cancer Research Institute trial. *J Clin Oncol*. 2014;32(4):282-287. doi:10.1200/JCO.2013.49.7586
71. Peyrade F, Bologna S, Delwail V, et al. Combination of ofatumumab and reduced-dose CHOP for diffuse large B-cell lymphomas in patients aged 80 years or older: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial from the LYSA group. *Lancet Haematol*. 2017;4(1):e46-e55. doi:10.1016/S2352-3026(16)30171-5
72. Schmitz N, Zeynalova S, Nickelsen M, et al. CNS International Prognostic Index: A Risk Model for CNS Relapse in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With R-CHOP. *J Clin Oncol*. 2016;34(26):3150-3156. doi:10.1200/JCO.2015.65.6520
73. Savage KJ, Slack GW, Mottok A, et al. Impact of dual expression of MYC and BCL2 by immunohistochemistry on the risk of CNS relapse in DLBCL. *Blood*. 2016;127(18):2182-2188. doi:10.1182/BLOOD-2015-10-676700
74. Klanova M, Sehn LH, Bence-Bruckler I, et al. Integration of cell of origin into the clinical CNS International Prognostic Index improves CNS relapse prediction in DLBCL. *Blood*. 2019;133(9):919-926. doi:10.1182/BLOOD-2018-07-862862
75. Cheah CY, Herbert KE, O'Rourke K, et al. A multicentre retrospective comparison of central nervous system prophylaxis strategies among patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Cancer*. 2014;111(6):1072-1079. doi:10.1038/BJC.2014.405
76. Eyre TA, Djebbari F, Kirkwood AA, Collins GP. Efficacy of central nervous system prophylaxis with stand-alone intrathecal chemotherapy in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with anthracycline-based chemotherapy in the rituximab era: a systematic review. *Haematologica*. 2020;105(7):1914-1924. doi:10.3324/HAEMATOL.2019.229948

77. Maurer MJ, Ghesquières H, Jais JP, et al. Event-free survival at 24 months is a robust end point for disease-related outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *J Clin Oncol*. 2014;32(10):1066-1073. doi:10.1200/JCO.2013.51.5866
78. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood*. 2017;130(16):1800-1808. *Blood*. 2018;131(5):587-588. doi:10.1182/BLOOD-2017-11-817775
79. Wang Y, Farooq U, Link BK, et al. Late Relapses in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Immunochemotherapy. *J Clin Oncol*. 2019;37(21):1819-1827. doi:10.1200/JCO.19.00014
80. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, et al. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1995;333(23):1540-1545. doi:10.1056/NEJM199512073332305
81. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2010;28(27):4184-4190. doi:10.1200/JCO.2010.28.1618
82. Crump M, Kuruvilla J, Couban S, et al. Randomized comparison of gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin versus dexamethasone, cytarabine, and cisplatin chemotherapy before autologous stem-cell transplantation for relapsed and refractory aggressive lymphomas: NCIC-CTG LY.12. *J Clin Oncol*. 2014;32(31):3490-3496. doi:10.1200/JCO.2013.53.9593
83. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2531-2544. doi:10.1056/NEJMOA1707447
84. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2019;380(1):45-56. doi:10.1056/NEJMOA1804980
85. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet*. 2020;396(10254):839-852. doi:10.1016/S0140-6736(20)31366-0
86. Jacobson C, Locke FL, Ghobadi A, et al. Long-Term (≥ 4 Year and ≥ 5 Year) Overall Survival (OS) By 12- and 24-Month Event-Free Survival (EFS): An Updated Analysis of ZUMA-1, the Pivotal Study of Axicabtagene Ciloleucel (Axi-Cel) in Patients (Pts) with Refractory Large B-Cell Lymphoma (LBCL). *Blood*. 2021;138(Supplement 1):1764-1764. doi:10.1182/BLOOD-2021-148078
87. Schuster SJ, Tam CS, Borchmann P, et al. Long-term clinical outcomes of tisagenlecleucel in patients with relapsed or refractory aggressive B-cell lymphomas (JULIET): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2021;22(10):1403-1415. doi:10.1016/S1470-2045(21)00375-2
88. Locke FL, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel as Second-Line Therapy for Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2022;386(7):640-654. doi:10.1056/nejmoa2116133

89. Bishop MR, Dickinson M, Purtill D, et al. Second-Line Tisagenlecleucel or Standard Care in Aggressive B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2022;386(7):629-639. doi:10.1056/NEJMOA2116596
90. Kamdar M, Solomon SR, Arnason J, et al. Lisocabtagene maraleucel versus standard of care with salvage chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation as second-line treatment in patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma (TRANSFORM): results from an interim analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet*. 2022;399(10343):2294-2308. doi:10.1016/S0140-6736(22)00662-6
91. Abramson JS, Solomon SR, Arnason J, et al. Lisocabtagene maraleucel as second-line therapy for large B-cell lymphoma: primary analysis of the phase 3 TRANSFORM study. *Blood*. 2023;141(14):1675-1684. doi:10.1182/BLOOD.2022018730
92. Westin JR, Oluwole OO, Kersten MJ, et al. Survival with Axicabtagene Ciloleucel in Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2023;389(2):148-157. doi:10.1056/NEJMOA2301665
93. Berning P, Shumilov E, Maulhardt M, et al. Chimeric antigen receptor-T cell therapy shows similar efficacy and toxicity in patients with diffuse large B-cell lymphoma aged 70 and older compared to younger patients: A multicenter cohort study. *Hemasphere*. 2024;8(3). doi:10.1002/HEM3.54
94. Ram R, Grisariu S, Shargian-Alon L, et al. Toxicity and efficacy of chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma above the age of 70 years compared to younger patients - a matched control multicenter cohort study. *Haematologica*. 2022;107(5):1111-1118. doi:10.3324/HAEMATOL.2021.278288
95. Neelapu SS, Jacobson CA, Oluwole OO, et al. Outcomes of older patients in ZUMA-1, a pivotal study of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma. *Blood*. 2020;135(23):2106-2109. doi:10.1182/BLOOD.2019004162
96. Westin JR, Locke FL, Dickinson M, et al. Safety and Efficacy of Axicabtagene Ciloleucel versus Standard of Care in Patients 65 Years of Age or Older with Relapsed/Refractory Large B-Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2023;29(10):1894-1905. doi:10.1158/1078-0432.CCR-22-3136
97. Dreger P, Holtick U, Subklewe M, et al. Impact of age on outcome of CAR-T cell therapies for large B-cell lymphoma: the GLA/DRST experience. *Bone Marrow Transplant*. 2023;58(2):229-232. doi:10.1038/S41409-022-01867-4
98. Sehgal A, Hoda D, Riedell PA, et al. Lisocabtagene maraleucel as second-line therapy in adults with relapsed or refractory large B-cell lymphoma who were not intended for haematopoietic stem cell transplantation (PILOT): an open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2022;23(8):1066-1077. doi:10.1016/S1470-2045(22)00339-4
99. Salles G, Duell J, González Barca E, et al. Tafasitamab plus lenalidomide in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (L-MIND): a multicentre, prospective, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2020;21(7):978-988. doi:10.1016/S1470-2045(20)30225-4
100. Duell J, Maddocks KJ, González-Barca E, et al. Long-term outcomes from the Phase II L-MIND study of tafasitamab (MOR208) plus lenalidomide in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2021;106(9):2417-2426. doi:10.3324/HAEMATOL.2020.275958

101. Palanca-Wessels MCA, Czuczman M, Salles G, et al. Safety and activity of the anti-CD79B antibody-drug conjugate polatuzumab vedotin in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1 study. *Lancet Oncol.* 2015;16(6):704-715. doi:10.1016/S1470-2045(15)70128-2
102. Sehn LH, Herrera AF, Flowers CR, et al. Polatuzumab Vedotin in Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2020;38(2):155-165. doi:10.1200/JCO.19.00172
103. Ohmachi K, Niitsu N, Uchida T, et al. Multicenter phase II study of bendamustine plus rituximab in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2013;31(17):2103-2109. doi:10.1200/JCO.2012.46.5203
104. Vacirca JL, Acs PI, Tabbara IA, Rosen PJ, Lee P, Lynam E. Bendamustine combined with rituximab for patients with relapsed or refractory diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol.* 2014;93(3):403-409. doi:10.1007/S00277-013-1879-X
105. Caimi PF, Ai W, Alderuccio JP, et al. Loncastuximab tesirine in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (LOTIS-2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2021;22(6):790-800. doi:10.1016/S1470-2045(21)00139-X
106. Hutchings M, Morschhauser F, Iacoboni G, et al. Glofitamab, a Novel, Bivalent CD20-Targeting T-Cell-Engaging Bispecific Antibody, Induces Durable Complete Remissions in Relapsed or Refractory B-Cell Lymphoma: A Phase I Trial. *J Clin Oncol.* 2021;39(18):1959-1970. doi:10.1200/JCO.20.03175
107. Dickinson MJ, Carlo-Stella C, Morschhauser F, et al. Glofitamab for Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2022;387(24):2220-2231. doi:10.1056/NEJMOA2206913
108. Hutchings M, Carlo-Stella C, Morschhauser F, Blood EB, 2022 undefined. Relapse is uncommon in patients with large B-cell lymphoma who are in complete remission at the end of fixed-course glofitamab treatment. *ashpublications.org* M Hutchings, C Carlo-Stella, F Morschhauser, E Bachy, P Corradini, G Iacoboni, C KhanBlood, 2022•ashpublications.org. Accessed October 24, 2024. <https://ashpublications.org/blood/article/140/Supplement%201/1062/491024>
109. Thieblemont C, Phillips T, Ghesquieres H, et al. Epcoritamab, a Novel, Subcutaneous CD3xCD20 Bispecific T-Cell-Engaging Antibody, in Relapsed or Refractory Large B-Cell Lymphoma: Dose Expansion in a Phase I/II Trial. *J Clin Oncol.* 2023;41(12):2238-2247. doi:10.1200/JCO.22.01725
110. Bartlett NL, Assouline S, Giri P, et al. Mosunetuzumab monotherapy is active and tolerable in patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 2023;7(17):4926-4935. doi:10.1182/BLOODADVANCES.2022009260
111. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nat Rev Genet.* Published online 2012. doi:10.1038/nrg3182
112. Susan V. Lynch OP. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *New England Journal of Medicine.* 2016;375:2369-2379.
113. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome Project. *Nature.* 2007;449(7164):804-810. doi:10.1038/nature06244

114. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003;361(9356):512-519. doi:10.1016/S0140-6736(03)12489-0
115. Giamarellos-Bourboulis E, Tang J, Pyleris E, et al. Molecular assessment of differences in the duodenal microbiome in subjects with irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol*. 2015;50(9):1076-1087. doi:10.3109/00365521.2015.1027261
116. Bengmark S. Pre-, pro- and synbiotics. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2001;4(6):571-579. doi:10.1097/00075197-200111000-00019
117. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol*. 1977;31:107-133. doi:10.1146/ANNUREV.MI.31.100177.000543
118. Hayashi H, Sakamoto M, Kitahara M, Benno Y. Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiol Immunol*. 2003;47(8):557-570. doi:10.1111/J.1348-0421.2003.TB03418.X
119. Hold GL, Pryde SE, Russell VJ, Furrie E, Flint HJ. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol*. 2002;39(1):33-39. doi:10.1111/J.1574-6941.2002.TB00904.X
120. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635-1638. doi:10.1126/SCIENCE.1110591
121. von Martels JZH, Sadaghian Sadabad M, Bourgonje AR, et al. The role of gut microbiota in health and disease: In vitro modeling of host-microbe interactions at the aerobe-anaerobe interphase of the human gut. *Anaerobe*. 2017;44:3-12. doi:10.1016/J.ANAEROBE.2017.01.001
122. Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(34):13780-13785. doi:10.1073/PNAS.0706625104
123. Lam SY, Yu J, Wong SH, Peppelenbosch MP, Fuhler GM. The gastrointestinal microbiota and its role in oncogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017;31(6):607-618. doi:10.1016/J.BPG.2017.09.010
124. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012;491(7422):119-124. doi:10.1038/NATURE11582
125. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(31):11070-11075. doi:10.1073/PNAS.0504978102
126. Buddington RK, Sangild PT. Companion animals symposium: Development of the mammalian gastrointestinal tract, the resident microbiota, and the role of diet in early life. *J Anim Sci*. Published online 2011. doi:10.2527/jas.2010-3705
127. Benson AK, Kelly SA, Legge R, et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Published online 2010. doi:10.1073/pnas.1007028107
128. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*. 2014;159(4):789-799. doi:10.1016/j.cell.2014.09.053

129. Candela M, Biagi E, Maccaferri S, Turrone S, Brigidi P. Intestinal microbiota is a plastic factor responding to environmental changes. *Trends Microbiol.* 2012;20(8):385-391. doi:10.1016/j.tim.2012.05.003
130. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome The Human Microbiome Project Consortium*. *Nature*. Published online 2012.
131. Grönlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999;28(1):19-25. doi:10.1097/00005176-199901000-00007
132. Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;30(1):61-67. doi:10.1097/00005176-200001000-00019
133. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 2007;5(7):1556-1573. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.0050177
134. Groer MW, Luciano AA, Dishaw LJ, Ashmeade TL, Miller E, Gilbert JA. Development of the preterm infant gut microbiome: a research priority. *Microbiome.* 2014;2(1). doi:10.1186/2049-2618-2-38
135. Sekirov I, Russell SL, Caetano M Antunes L, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90(3):859-904. doi:10.1152/PHYSREV.00045.2009
136. Holmes E, Li J V., Athanasiou T, Ashrafi H, Nicholson JK. Understanding the role of gut microbiome-host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends Microbiol.* 2011;19(7):349-359. doi:10.1016/J.TIM.2011.05.006
137. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science.* 2011;334(6052):105-108. doi:10.1126/SCIENCE.1208344
138. Ou J, Carbonero F, Zoetendal EG, et al. Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. *Am J Clin Nutr.* 2013;98(1):111-120. doi:10.3945/AJCN.112.056689
139. O'Keefe SJD, Li J V., Lahti L, et al. Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. *Nat Commun.* 2015;6. doi:10.1038/NCOMMS7342
140. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(12):2687-2692. doi:10.1038/AJG.2010.398
141. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 2008;6(11):2383-2400. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.0060280
142. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut.* 1994;35(4):483-489. doi:10.1136/GUT.35.4.483

143. Hooper L V., Xu J, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JI. A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(17):9833-9838. doi:10.1073/PNAS.96.17.9833
144. Brook I. Bacterial interference. *Crit Rev Microbiol*. 1999;25(3):155-172. doi:10.1080/10408419991299211
145. Lievin V, Peiffer I, Hudault S, et al. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*. 2000;47(5):646-652. doi:10.1136/GUT.47.5.646
146. Arpaia N, Campbell C, Fan X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 2013;504(7480):451-455. doi:10.1038/NATURE12726
147. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013;504(7480):446-450. doi:10.1038/NATURE12721
148. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*. 2011;331(6015):337-341. doi:10.1126/SCIENCE.1198469
149. Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C. Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol*. 1986;132(6):1647-1656. doi:10.1099/00221287-132-6-1647
150. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013;341(6145):569-573. doi:10.1126/SCIENCE.1241165
151. Chen W ju L, Anderson JW, Jennings D. Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1984;175(2):215-218. doi:10.3181/00379727-175-41791
152. Berggren AM, Nyman EMGL, Lundquist I, Björck IME. Influence of orally and rectally administered propionate on cholesterol and glucose metabolism in obese rats. *Br J Nutr*. 1996;76(2):287-294. doi:10.1079/BJN19960032
153. Wong JMW, De Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40(3):235-243. doi:10.1097/00004836-200603000-00015
154. Honda K, Littman DR. The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:759-795. doi:10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-020711-074937
155. GIBSON PR, MOELLER I, KAGELARI O, FOLINO M, YOUNG GP. Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells in vitro. *J Gastroenterol Hepatol*. 1992;7(2):165-172. doi:10.1111/J.1440-1746.1992.TB00956.X
156. Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M, et al. Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut*. 2000;46(4):507-514. doi:10.1136/GUT.46.4.507
157. Bultman SJ. The microbiome and its potential as a cancer preventive intervention. *Semin Oncol*. 2016;43(1):97-106. doi:10.1053/J.SEMINONCOL.2015.09.001

158. De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 2012;13(6):607-615. doi:10.1016/S1470-2045(12)70137-7
159. Dunn KA, MacDonald T, Rodrigues GJ, et al. Antibiotic and antifungal use in pediatric leukemia and lymphoma patients are associated with increasing opportunistic pathogens and decreasing bacteria responsible for activities that enhance colonic defense. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12. doi:10.3389/FCIMB.2022.924707
160. Viaud S, Saccheri F, Mignot G, et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science.* 2013;342(6161):971-976. doi:10.1126/SCIENCE.1240537
161. Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science.* 2013;342(6161):967-970. doi:10.1126/SCIENCE.1240527
162. Pflug N, Kluth S, Vehreschild JJ, et al. Efficacy of antineoplastic treatment is associated with the use of antibiotics that modulate intestinal microbiota. *Oncoimmunology.* 2016;5(6). doi:10.1080/2162402X.2016.1150399
163. Shono Y, Van Den Brink MRM. Gut microbiota injury in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(5):283-295. doi:10.1038/NRC.2018.10
164. Hong T, Wang R, Wang X, et al. Interplay Between the Intestinal Microbiota and Acute Graft-Versus-Host Disease: Experimental Evidence and Clinical Significance. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/FIMMU.2021.644982
165. Ingham AC, Kielsen K, Mordhorst H, et al. Microbiota long-term dynamics and prediction of acute graft-versus-host disease in pediatric allogeneic stem cell transplantation. *Microbiome.* 2021;9(1). doi:10.1186/S40168-021-01100-2
166. Margolis EB, Alfaro GM, Sun Y, et al. Microbiota Predict Infections and Acute Graft-Versus-Host Disease After Pediatric Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Infect Dis.* 2023;228(5):627-636. doi:10.1093/INFDIS/JIAD190
167. Jørgensen M, Nørgaard JC, Ilett EE, et al. Metabolic Potential of the Gut Microbiome Is Significantly Impacted by Conditioning Regimen in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients. *Int J Mol Sci.* 2022;23(19). doi:10.3390/IJMS231911115
168. Hong T, Wang R, Wang X, et al. Interplay Between the Intestinal Microbiota and Acute Graft-Versus-Host Disease: Experimental Evidence and Clinical Significance. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/FIMMU.2021.644982
169. Yuan L, Wang W, Zhang W, et al. Gut Microbiota in Untreated Diffuse Large B Cell Lymphoma Patients. *Front Microbiol.* 2021;12. doi:10.3389/FMICB.2021.646361
170. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 2015;33(9):496-503. doi:10.1016/J.TIBTECH.2015.06.011
171. Tang W, Zhu G, Shi Q, et al. Characterizing the microbiota in gastrointestinal tract segments of *Rhabdophis subminiatus*: Dynamic changes and functional predictions. *Microbiologyopen.* 2019;8(7). doi:10.1002/MBO3.789

172. Li J, Zhang AH, Wu FF, Wang XJ. Alterations in the Gut Microbiota and Their Metabolites in Colorectal Cancer: Recent Progress and Future Prospects. *Front Oncol.* 2022;12. doi:10.3389/FONC.2022.841552
173. Yoon SE, Kang W, Choi S, et al. The influence of microbial dysbiosis on immunochemotherapy-related efficacy and safety in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2023;141(18):2224-2238. doi:10.1182/BLOOD.2022018831
174. Stein-Thoeringer CK, Saini NY, Zamir E, et al. A non-antibiotic-disrupted gut microbiome is associated with clinical responses to CD19-CAR-T cell cancer immunotherapy. *Nat Med.* 2023;29(4):906-916. doi:10.1038/S41591-023-02234-6
175. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* 2012;209(5):903-911. doi:10.1084/JEM.20112408
176. Lin Z, Mao D, Jin C, et al. The gut microbiota correlate with the disease characteristics and immune status of patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma. *Front Immunol.* 2023;14. doi:10.3389/FIMMU.2023.1105293
177. Yoon SE, Kang W, Choi S, et al. The influence of microbial dysbiosis on immunochemotherapy-related efficacy and safety in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2023;141(18):2224-2238. doi:10.1182/BLOOD.2022018831