



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

*“Biologia molecolare e applicata”*

---

**STUDIO IN CITOMETRIA A FLUSSO MULTICOLORE DELL'ASSETTO  
IMMUNOLOGICO IN PAZIENTI AFFETTI DA CARCINOMA RENALE  
METASTATICO TRATTATI IN PRIMA LINEA CON  
IMMUNOCOMBINAZIONE**

**ASSESSMENT OF THE IMMUNOLOGICAL PROFILE OF PATIENTS  
WITH METASTATIC RENAL CELL CARCINOMA TREATED IN FIRST-  
LINE WITH IMMUNOCOMBINATION BY MULTICOLOUR FLOW  
CYTOMETRY**

Tesi di Laurea Magistrale

di:

Selene Mori

Relatore

Chiar.mo Prof.

Elisabetta Damiani

Correlatore

Davide Vagnoni

Anno Accademico 2021/2022

## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Carcinoma renale</b>	<b>1</b>
<b>1.2. L'emopoiesi</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Sistema immunitario</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1. Sottopopolazioni linfocitarie</b>	<b>12</b>
<b>1.4. Terapia con farmaci biologici immunomodulanti nelle neoplasie renali</b>	<b>20</b>
<b>1.4.1. Tirosin chinasi inibitori</b>	<b>25</b>
<b>1.4.2. mTOR</b>	<b>29</b>
<b>2. SCOPO TESI</b>	<b>34</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Campioni in esame (Criteri di inclusione ed esclusione)</b>	<b>35</b>
<b>3.2. Trattamento del campione</b>	<b>36</b>
<b>3.3. Citofluorimetria: cenni storici e caratteristiche</b>	<b>37</b>
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>49</b>
<b>5. CONCLUSIONE</b>	<b>61</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>63</b>
<b>7. SITOGRAFIA</b>	<b>74</b>
<b>8. RINGRAZIAMENTI</b>	<b>75</b>

## INTRODUZIONE

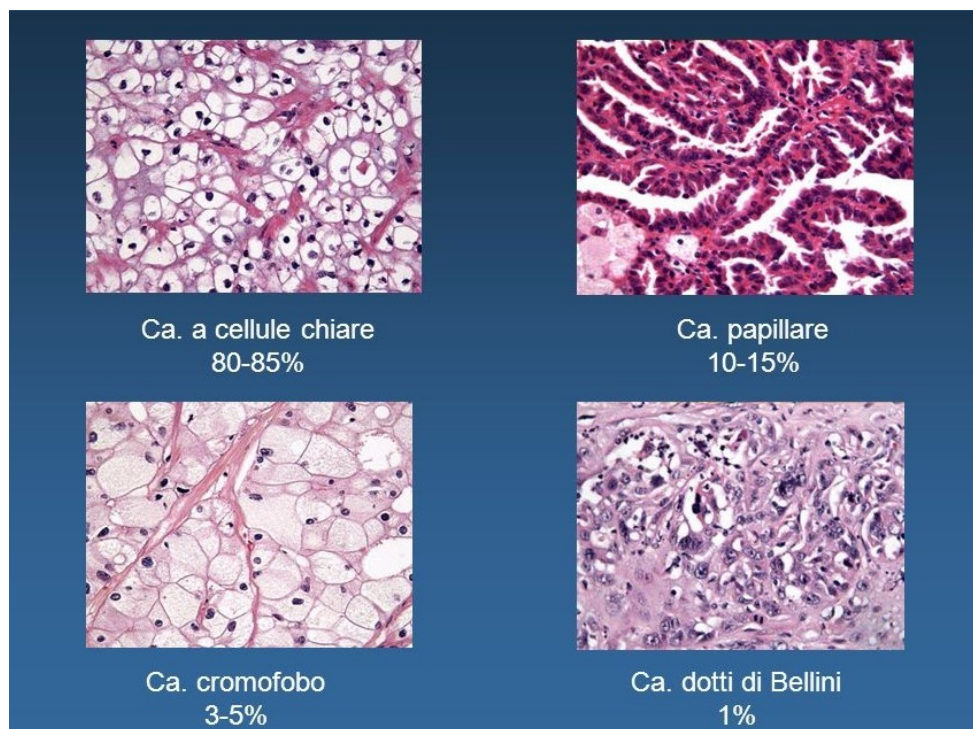
### 1.1. *Carcinoma renale*

Il carcinoma a cellule renali (RCC) noto anche come ipernefroma o tumore di Grawtz, costituisce oltre il 90% di tutte le neoplasie renali (Siegel RL et al, 2020). L'RCC origina dalla corteccia renale o dalle cellule epiteliali tubolari renali. Sono malattie eterogenee strettamente correlate; i sottotipi possono essere separati sulla base dei referti istologici, delle anomalie citogenetiche, del comportamento biologico e dell'aspetto delle immagini del tumore. Sulla base di caratteristici aspetti radiologici è classificato in:

- **RCC a cellule chiare (CCRCC):** è il tipo più comune (70-80%) di RCC (Fig. 1). I tumori sporadici sono generalmente singoli e unilaterali, a differenza delle lesioni familiari, che possono essere multiple e bilaterali. La superficie di taglio è gialla a causa di grandi quantità di lipidi nelle cellule, con ampie aree di necrosi ed emorragia. Il tumore ha una vascolarizzazione prominente e delicata con aree cistiche e solide. Microscopicamente appare da solido a trabecolare (cordone) o tubolare (simile a tubuli), raramente cistico. Le cellule tumorali sono rotonde o poligonali chiare (contenenti glicogeno e lipidi) o citoplasma granulare rosa (ricco di mitocondri). (Algaba F et al, 2011; Moch H et al, 2016);

- **RCC papillare (PRCC):** rappresenta circa il 10-15% di tutti i tumori renali (Fig. 1). A differenza del CCRCC, anche i tumori sporadici possono essere multifocali e bilaterali. Grossolanamente il tumore è ben circoscritto, bianco-grigiastro e tipicamente mostra necrosi centrale e frequenti emorragie. Istologicamente, la PRCC ha due sottotipi principali:
  - 1) Tipo 1: sono multifocali e caratterizzati da papille e strutture tubulari ricoperte da piccole cellule contenenti citoplasma basofilo e nuclei piccoli, uniformi e ovali.
  - 2) Tipo 2: ha un pattern eterogeneo caratterizzato da papille ricoperte da grandi cellule contenenti citoplasma eosinofilo e grandi nuclei sferici con nucleoli prominenti, suggerendo un tumore più aggressivo. (Algaba F et al, 2011; Moch H et al, 2016);
- **RCC cromofobo (ChRCC):** costituisce circa il 5% di tutti i RCC. Si pensa che derivino da cellule intercalate dei dotti collettori (Fig. 1). Il tumore si presenta come uno o più noduli e ha una superficie lobulata. La superficie tagliata del tumore appare di colore arancione che diventa bianco-grigiastro sulla fissazione in formalina. Il modello del tumore è per lo più solido, occasionalmente cribroso e può avere calcificazioni

focali. Istologicamente sono costituiti da grandi cellule poligonali basiche che hanno un citoplasma trasparente leggermente reticolato e aloni perinucleari con vascolarizzazione a pareti spesse. Sono difficili da distinguere dall'oncocitoma. (Algaba F et al, 2011; Moch H et al, 2016)



**Figura 1.** Istologia dei tumori renali: Trattamento chirurgico delle neoformazioni renali in pazienti con carcinoma della tiroide XVI Congresso SUN Torino, Novembre 2014, Filippo M. Turri – [www.slideplayer.it](http://www.slideplayer.it).

L'RCC elencati rappresentano circa l'85% di tutti i tumori renali primari mentre l'altro 15% è costituito da: carcinoma a cellule transizionali, tumore di Wilms o nefroblastoma, tumori dei dotti collettori (dotto di Bellini – Fig. 1) e sarcomi renali (Hsieh JJ et al, 2017). L'RCC può svilupparsi per cause

genetiche o acquisite. Le due anomalie genetiche più comuni sono il gene Von Hippel-Lindau (VHL) e il gene della proteina polibromo-1 (PBRM-1). Normalmente, VHL è un gene oncosoppressore che regola i livelli delle proteine intracellulari e dei fattori inducibili dall'ipossia, HIF1A e HIF2A (Swami U et al, 2019; Cohen HT et al, 2005). Un gene VHL difettoso determina l'interazione tra le proteine intracellulari con conseguente sovraregolazione dell'RNA messaggero (mRNA) che codifica per fattori di crescita come il fattore di crescita beta derivato dalle piastrine (PDGFB), il fattore di crescita delle cellule endoteliali vascolari (VEGF) e la crescita trasformante fattore alfa (TGFA). Tutti questi fattori di crescita promuovono lo sviluppo di tumori vascolari. In condizioni normali di ossigeno, HIF1A e HIF2A subiscono idrossilazione, si legano a una proteina chiamata pVHL e vengono degradati. In condizioni ipossiemiche o in assenza di pVHL, l'HIF1A si accumula, portando alla sovraregolazione dell'mRNA e all'aumento della produzione dei fattori di crescita (Cohen H et al, 2005; Karami S et al, 2010). Le cause acquisite, invece, comprendono la dipendenza a lungo termine dalla dialisi, l'anamnesi di fumo, l'uso di analgesici a lungo termine, l'obesità, l'ipertensione e il diabete (Scandling JD et al, 2007; Schwarz A et al, 2007). I carcinomi a cellule renali (RCC) di solito rimangono asintomatici fino alla fase avanzata della malattia e oltre il 50% dei tumori può essere rilevato incidentalmente (Luciani LG et al,

2000). Solo il 10-15% dei pazienti può presentare la cosiddetta "triade classica" di dolore al fianco dovuto all'effetto massa o all'allungamento della capsula renale, ematuria dovuta all'infiltrazione del tumore nel midollo renale e nei dotti collettori e massa renale palpabile (Skinner DG et al, 1971). Storicamente oltre il 60% dei pazienti presenta ematuria asintomatica. Altre caratteristiche includono: affaticamento, perdita di peso, febbre, sudorazione notturna, malessere, ipertensione e anemia. Nel complesso, l'incidenza è in costante aumento e attualmente è il 7° tumore più comune tra gli uomini di età compresa tra 60 e 70 anni. Tra i tumori genito-urinari, l'RCC ha il più alto tasso di mortalità. La prognosi dell'RCC metastatico è sfavorevole, con una sopravvivenza mediana di circa 13 mesi e una sopravvivenza a 5 anni inferiore al 10% (Cohen HT et al, 2005). Tuttavia, con le nuove terapie, come gli inibitori della tirosin chinasi (sunitinib, sorafenib, pazopanib, tivozanib, axitinib, lenvatinib e cabozantinib) e gli inibitori mTOR (everolimus e temsirolimus), la sopravvivenza globale è migliorata (Rini BI et al, 2014).

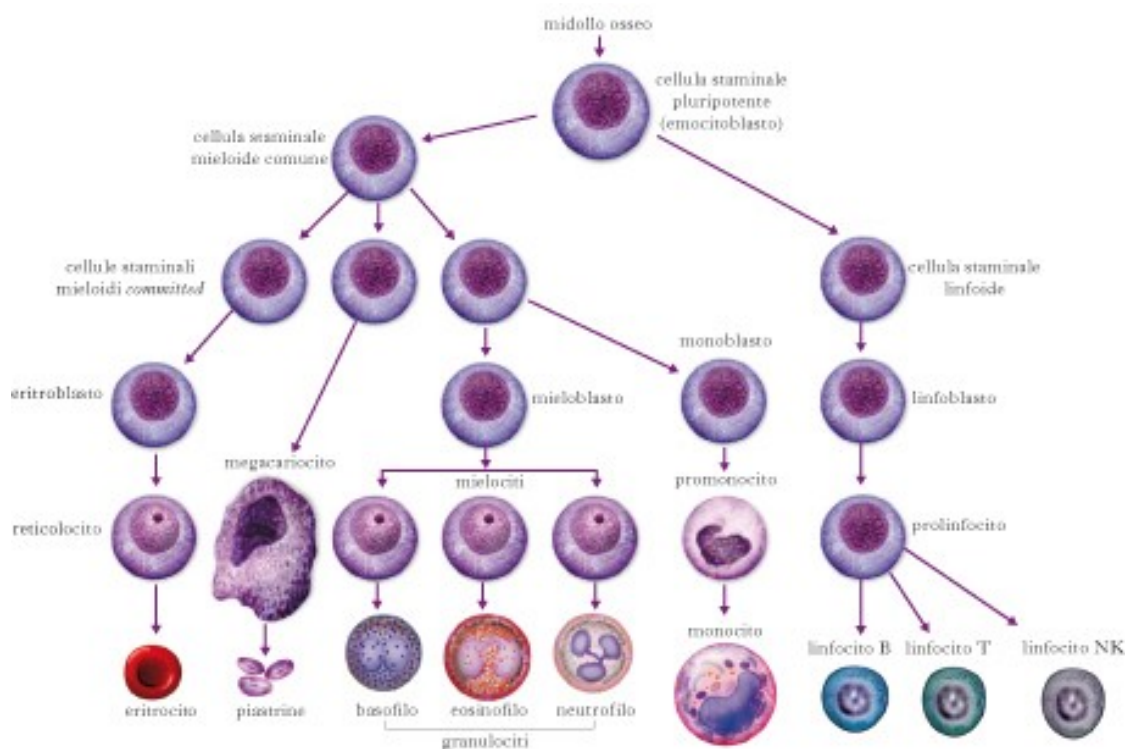
## ***1.2. L'emopoiesi***

L'emopoiesi, dal greco "aima" cioè sangue e "poiesis" ovvero creare, è un processo che determina la formazione degli elementi corpuscolati del sangue.

Il rinnovamento delle cellule mature del sangue, che si verifica durante l'emopoiesi, è assicurato dalla presenza di una circoscritta popolazione di cellule in grado di automantenersi e differenziare, e cioè le cellule staminali emopoietiche, che rappresentano lo 0.005-0.01 % della popolazione midollare. Mediante la "divisione asimmetrica", le cellule staminali sono capaci di autorinnovarsi (self-renewal). Infatti, nel processo di divisione asimmetrica, le cellule staminali si dividono generando due cellule figlie: una identica alla cellula madre e che andrà a sostituirsi ad essa e l'altra, una cellula progenitrice, che inizierà il processo di differenziamento e maturazione (McKenzie JL et al, 2006.). L'emopoiesi è perciò determinata da un insieme di cellule multipotenti, che sono capaci di automantenersi e di differenziare in progenitori che andranno poi a generare le diverse tipologie cellulari del sangue. L'iter attraverso il quale si vengono a formare gli elementi corpuscolati del sangue è suddivisibile in due processi differenti: mielopoiesi e linfopoiesi (Fig. 2). La mielopoiesi comprende l'eritropoiesi, cioè la formazione dei globuli rossi, la granulocitopoiesi, ovvero la formazione dei granulociti (neutrofili, basofili o eosinofili), la monocitopoiesi, cioè la formazione dei monociti ed infine la megacariocitopoiesi, ovvero la formazione delle piastrine (Fig. 2). Attraverso la linfopoiesi invece si originano i linfociti, di cui fanno parte i linfociti B, i linfociti T e i linfociti Natural killer (Fig. 2). L'emopoiesi risulta dalla



combinazione di mielopoiesi e linfoiesi (Tura S, 2015). Le cellule staminali proliferano mediante fattori di crescita, ormoni e attraverso il contributo di cellule neuronali controllate dal sistema adrenergico, le quali possono crescere dal midollo osseo in particolari condizioni in vitro. Il midollo osseo è costituito da un compartimento cellulare emopoietico, e da tessuto adiposo, entrambi potenziali fonti di cellule staminali, le quali sono collocate in prossimità della matrice ossea. La matrice ossea risulta essere la nicchia all'interno della quale le staminali e i progenitori interagiscono con gli osteoblasti per influenzare il self-renewal (automantenimento) e la differenziazione.



**Figura 2.** Emopoiesi: Enciclopedia Treccani in "Dizionario di Medicina" – [www.treccani.it](http://www.treccani.it)

### ***1.3 Sistema immunitario***

Il sistema immunitario è un sistema di difesa dell'ospite costituito da cellule diverse, ognuna con funzioni specifiche e molecole che lavorano insieme per eliminare gli agenti estranei all'organismo come batteri, parassiti, funghi e virus ma anche cellule infettate da agenti patogeni e cellule tumorali. Il sistema immune possiede tre principali caratteristiche funzionali che lo differenziano dagli altri sistemi di difesa dell'organismo. La prima è la sua estrema specificità, ovvero la capacità di riconoscere e distinguere tra un vasto numero di differenti molecole bersaglio o di rispondere (o non rispondere) singolarmente a ciascuna di queste. La seconda sta nella sua capacità di discriminare tra self (antigeni propri) e non self (antigeni estranei), per cui coesiste normalmente con le innumerevoli proteine e gli altri materiali organici prodotti dall'ospite, ma risponde vigorosamente contro sostanze estranee, come cellule o tessuti di altri soggetti. La terza è la sua memoria, ovvero la capacità di essere rimodellato dalle proprie esperienze, cosicché il successivo contatto con una noxa estranea provoca una risposta più rapida e più intensa di quella iniziale. Le risposte del sistema immunitario sono tradizionalmente classificate in due categorie:

- *L'immunità naturale*, chiamata anche immunità innata o non-specifica, rappresenta la prima linea di difesa ed è basata su meccanismi che

proteggono l'organismo dall'attacco di agenti esterni potenzialmente pericolosi. Questi meccanismi non sono specifici, nel senso che rispondono in modo simile a una grande varietà di stimoli esterni (microrganismi, proteine e carboidrati, etc.) e sono generalmente costitutivi, cioè presenti anche senza stimolazione. In caso di necessità si possono avere aumenti quantitativi dei componenti della risposta naturale, ma, terminato lo stimolo, essi tornano allo stato basale. Gli agenti patogeni vengono riconosciuti per la loro composizione molecolare diversa dalle molecole riconosciute normalmente dalla cellula. Il riconoscimento di queste strutture avviene tramite dei recettori di membrana detti pattern recognition receptor (PRRs). Di solito gli agenti patogeni non riescono ad entrare negli organismi per la presenza delle barriere meccaniche (pelle integra o mucose dei tratti digestivo, respiratorio e riproduttivo) o vengono fermati dalle condizioni sfavorevoli (pH o temperatura corporea come la febbre) (Fig. 3). Quando le barriere di superficie non riescono a impedire l'accesso ai tessuti, entrano in azione altri meccanismi. Le cellule responsabili dell'immunità innata derivano da cellule staminali pluripotenti della linea mieloide (come monociti, macrofagi, granulociti) e della linea linfoide (come linfociti e cellule natural killer) (Fig. 3);

- *L'immunità specifica* o adattativa, anche conosciuta come immunità acquisita, è quella da cui derivano le risposte immunitarie specifiche che aumentano di efficacia ad ogni stimolazione successiva, integrandosi con quelle dell'immunità innata (Fig. 3).

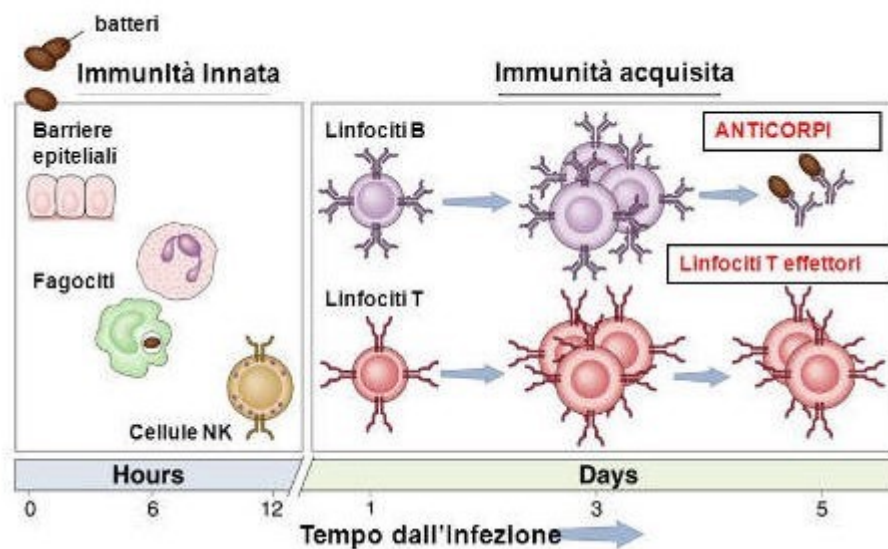


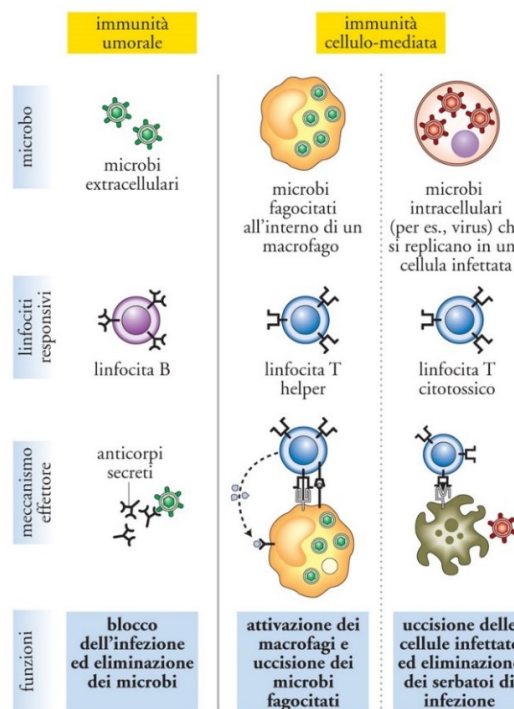
Figura 3. Risposta immunitaria: Innata e acquisita - [www.scienze.uniroma2.it](http://www.scienze.uniroma2.it)

L'immunità adattativa si divide in:

- 1) *Immunità umorale*: mediata da anticorpi o immunoglobuline (Ig) prodotti dai linfociti B, che riconoscono e neutralizzano gli antigeni. I linfociti B circolanti inattivi hanno immunoglobuline sulla membrana che fanno da recettori (cloni linfocitari) a specifici antigeni e quando avviene il legame recettore-antigene (selezione clonale), il linfocita B si

attiva e inizia a proliferare. Parte dei linfociti B si differenzia in cellule effettrici ovvero plasmacellule, che producono e secernono attivamente anticorpi, mentre l'altra parte si differenzia in cellule della memoria, che rimangono attive anche dopo la scomparsa dello stimolo antigenico e permettono di avere una risposta immunitaria più efficace e veloce in caso di esposizione a quel determinato antigene (Fig. 4).

2) *Immunità cellulare*: mediata dai linfociti T che contribuiscono all'eliminazione di cellule neoplastiche (tumoriali) o cellule infettate da batteri e virus (Fig. 4).



**Figura 4.** Immunità umorale e cellulo-mediata: Enciclopedia Treccani in "Enciclopedia della Scienza e della Tecnica" – [www.treccani.it](http://www.treccani.it)

#### ***1.4 Linfociti e sottopopolazioni linfocitarie***

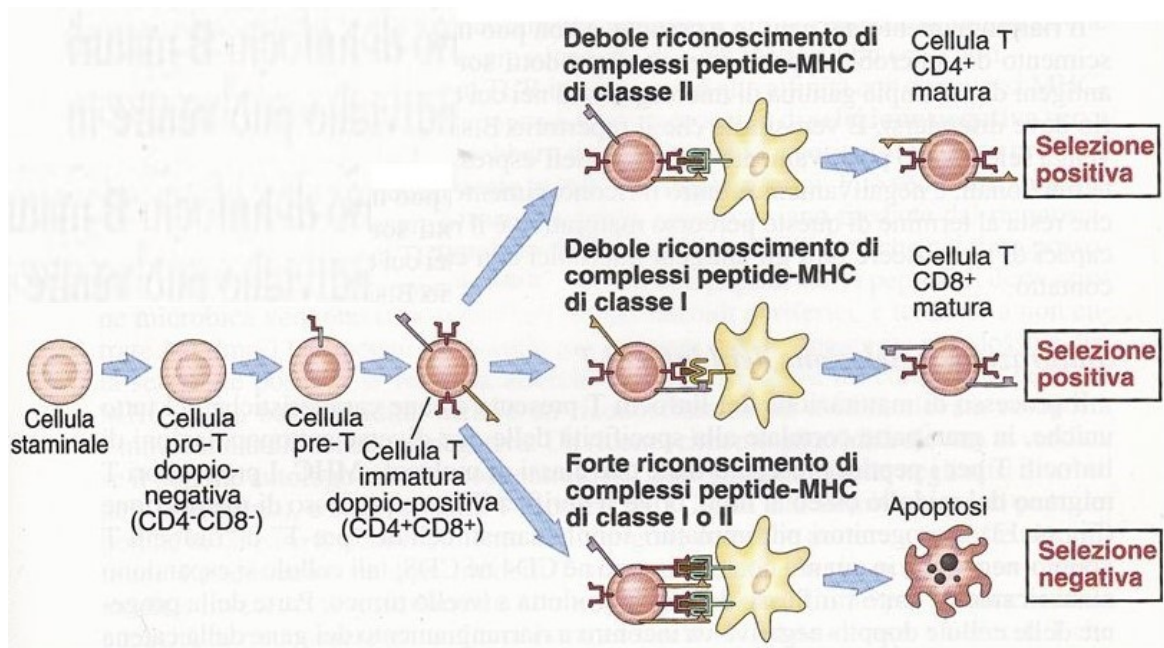
I linfociti rappresentano il prodotto della linfopoiesi, e sono cellule che troviamo nel sangue e in numerosi organi linfatici (linfonodi, timo, milza); rivestono un ruolo essenziale nelle reazioni di difesa e nella risposta immunitaria. I linfociti dal punto di vista morfologico sono caratterizzati da un citoplasma molto scarso che circonda un nucleo grande e rotondo color porpora. Hanno dimensioni leggermente maggiori rispetto ai globuli rossi, e costituiscono il 15-20% dei leucociti circolanti. Ma i linfociti ematici sono solo una piccola parte dei linfociti totali, i quali rappresentano la componente principale del sistema linfatico. I linfociti sono le cellule responsabili dell'immunità specifica, cioè della capacità dell'organismo di rispondere in maniera selettiva verso gli elementi patogeni come un batterio o una proteina estranea. Questo avviene per mezzo delle tre classi in cui si differenziano:

- **I linfociti T:** sono cellule derivate da una cellula staminale pluripotente del midollo osseo e maturate nel timo. Hanno un recettore caratteristico per l'antigene costituito da una specifica struttura detta TCR, T-Cell Receptor, associata a un insieme di molecole che formano un'unità strutturale, nota come CD3 che ha la funzione di trasmettere i segnali dal recettore al citoplasma ed è inoltre essenziale per il posizionamento del TCR sulla superficie cellulare. Si possono identificare varie

sottopopolazioni di cellule T, alcune delle quali svolgono un ruolo adiuvante, in quanto promuovono la proliferazione, la maturazione e le funzioni immunologiche di altre cellule, come la sottoclasse T helper ( $T_H$  cells), mentre altre possiedono caratteristiche citotossiche, cioè hanno l'abilità di uccidere cellule che esprimono macromolecole estranee sulla loro superficie, come la sottoclasse T citotossica (CTL o  $T_C$ ). Oltre al complesso CD3, i linfociti T helper sono caratterizzati funzionalmente anche da un'altra struttura, l'antigene CD4, mentre i linfociti T citotossici esprimono l'antigene CD8. Complessivamente, circa il 70% dei linfociti T nel sangue periferico o nei tessuti linfoidi secondari è  $CD4^+ CD8^-$  (chiamati anche linfociti CD4), mentre il 25% è  $CD4^- CD8^+$  (o linfociti CD8); le cellule con questi fenotipi sono spesso chiamate linfociti a singola positività (single-positive – Fig. 5) e sono le cellule più comunemente coinvolte nelle risposte immuni. Circa il 4% dei linfociti T al di fuori del timo è invece  $CD4^- CD8^-$  ossia costituiti da linfociti a doppia negatività (double-negative – Fig. 5), che esprimono quasi tutti una forma alternativa di recettore dei linfociti T composta da catene polipeptidiche  $\gamma$ ,  $\delta$  il rimanente 1% dei linfociti T extratimici è  $CD4^+ CD8^+$  o a doppia positività (double-positive – Fig. 5) e la loro funzione non è stata ancora del tutto chiarita. La correlazione del CD4 o

del CD8 con le funzioni helper e citotossica rispettivamente, è forte ma non assoluta: alcune cellule CD8 positive, infatti, hanno attività helper, viceversa alcune cellule CD4 positive sono citotossiche. L'attivazione dei linfociti T è indotta dal riconoscimento dell'antigene sulla membrana di altre cellule, solitamente macrofagi e cellule B, che l'hanno fagocitato, degradato e modificato. Se l'antigene è una proteina, i peptidi che ne derivano sono espressi sulla membrana di queste cellule dette Antigen-presenting cell (APC), in associazione con molecole di classe I o II, codificate da geni del complesso maggiore di istocompatibilità (Major histocompatibility complex o MHC). Le proteine dell'MHC di classe I sono espresse da tutti i tipi di cellule somatiche e cooperano con le cellule T CD8<sup>+</sup> (Fig. 5). D'altro canto, le proteine dell'MHC di classe II, sono espresse soltanto dai macrofagi e da pochi altri tipi cellulari e sono indispensabili per la presentazione dell'antigene alle cellule T CD4<sup>+</sup> (Fig. 5).





**Figura 5.** Maturazione e selezione dei linfociti T: Polo didattico Universitario, Scuola di Infermieristica G. Panico - [www.infermieristica.polodidatticopanico.com](http://www.infermieristica.polodidatticopanico.com)

Queste non sono le uniche caratteristiche che differenziano funzionalmente i linfociti T. Nell'ambito dei  $T_H$  possono essere distinti ulteriori sottoclassi in base alle citochine secrete dopo la loro attivazione, che promuovono differenti tipi di reazioni difensive. A tal proposito, le cellule appartenenti alla sottoclasse  $T_{H1}$  producono: IL-2, interferone-gamma ( $IFN-\gamma$ ) e tumor necrosis factor beta ( $TNF-\beta$ ) coinvolte nelle reazioni difensive mediate da macrofagi e da altri fagociti, mentre le cellule  $T_{H2}$  secernono IL-4, IL-5, IL-6, IL10 e IL-13, le quali agiscono come chemiotattici per le cellule B, i mastociti, i basofili e gli eosinofili (Mosmann TR et al, 1989). I linfociti T vergini e di memoria si trovano normalmente in uno stato di riposo nel quale non esprimono una

significativa attività helper o citotossica. Una volta attivate, queste cellule vanno incontro a numerose divisioni mitotiche da cui originano multiple cellule figlie, alcune delle quali tornano in uno stato di riposo come cellule memoria, altre si trasformano in cellule effettrici che esprimono attivamente funzioni helper o citotossiche. Le cellule effettrici della linea T possiedono numerosi tipi di proteine di superficie (come il CD25, il CD28, il CD29, il CD40L, il recettore per la transferrina e un gruppo di proteine MHC conosciuto come MHC di classe II) non condivise dalle cellule T a riposo ed esprimono in abbondante quantità alcuni marcatori costitutivi (come il CD2) delle cellule T. Quando lo stimolo che ha determinato l'attivazione si riduce sino a estinguersi, anche l'attività helper o citotossica diminuisce gradualmente nell'arco di alcuni giorni, cioè nel tempo necessario per la morte cellulare o per il ritorno a uno stato di riposo;

- **I linfociti B:** i progenitori delle cellule B si originano da precursori midollari con fenotipo CD34<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD38<sup>++</sup>, CD45<sup>dim</sup>, che vanno incontro ad un processo di maturazione durante il quale cominciano ad esprimere dei marcatori tipici della cellula matura, ovvero CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, con l'espressione citoplasmatica e di membrana delle immunoglobuline (IgM, IgD, IgG), perdendo al contempo gli

antigeni di immaturità (Chapentai S.P. et al, 2013). I linfociti B giovani sono rilasciati dal midollo osseo allo stadio definito “transitional” che è caratterizzato dal seguente fenotipo: CD19<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD24<sup>++</sup>, CD38<sup>++</sup>, CD45<sup>+</sup>, IgM<sup>++</sup>, IgD<sup>+</sup>. Da questo stadio in poi aumenta l’intensità di espressione di CD20 e di IgD (Capolunghi F et al, 2008). Una volta rilasciati nel sangue periferico, i linfociti B intraprendono un pathway di ricircolo complesso tra linfonodi ed altri organi linfoidei secondari, dove avverranno i processi di ipermutazione somatica e l’acquisizione della specificità antigenica e della memoria (Fig. 6). La comparsa del marker CD27 definisce il linfocita B memoria (Klein U et al, 1998). A questo stadio sono possibili due pathways differenti: o l’interazione con i linfociti T nei centri germinativi linfoidei che darà origine ai cosiddetti linfociti B memoria CD27<sup>+</sup>, IgG switched, responsabili dell’immunità acquisita oppure la differenziazione T-indipendente che genererà linfociti B memoria CD27<sup>+</sup>, IgM unswitched, coinvolti nell’immunità naturale (Capolunghi F et al, 2008; Aranburu A et al, 2010). Se ci sarà un contatto con l’antigene, i linfociti B memoria si divideranno rapidamente, differenziandosi in plasmablasti e plasmacellule, secernenti anticorpi (Perez-Andres M et al, 2010) (Fig 6). I plasmablasti si ritrovano in circolo in scarsa quantità negli individui normali e

perdono alcuni degli antigeni di differenziazione B ad eccezione di CD19, esprimendo parzialmente il marcatore plasmacellulare CD138. I plasmablasti trovano la loro nicchia nel midollo osseo ed in altri organi linfoidi dove completeranno la loro maturazione differenziandosi in plasmacelle con fenotipo CD38<sup>++</sup>, CD138<sup>++</sup>, CD19<sup>+</sup> ed espressione citoplasmatica di immunoglobuline (Caraux A et al, 2010);

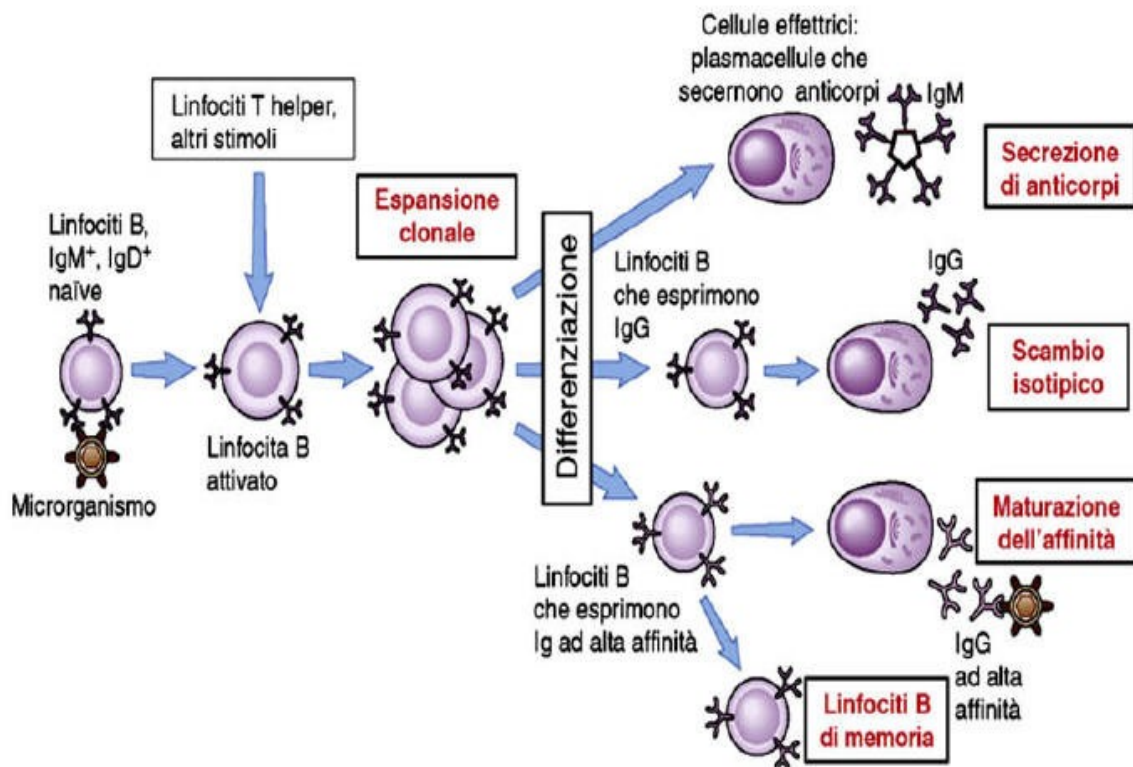
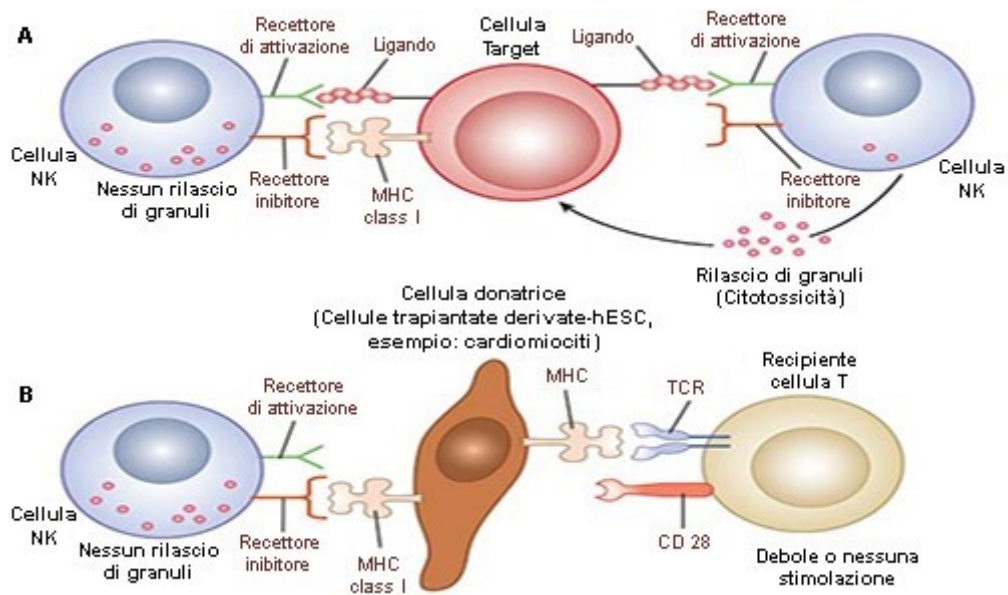


Figura. 6. Differenziazione linfociti B - [www.docenti.unina.it](http://www.docenti.unina.it)

- **Le cellule Natural Killer (NK):** sono cellule linfocitarie derivate dal midollo osseo, in grado di svolgere attività citotossica nel corso della risposta immunitaria innata. I linfociti NK detti anche LGL, Large Granular Lymphocyte o grandi linfociti granulari, usano granuli

citoplasmatici contenenti perforine e granzimi per uccidere le cellule bersaglio (Fig. 7 - A). Le cellule NK sono state inizialmente definite grazie alla loro abilità di lisare, in vitro, alcune linee di cellule tumorali e di cellule infettate da virus (Trinchieri G, 1989). L'attività delle NK contro questi bersagli è spontanea e si osserva anche in individui che non sono stati precedentemente esposti all'antigene (da qui la denominazione di "natural killer"). Quasi tutte le cellule NK esprimono CD16 (un recettore Fc a bassa affinità che lega le IgG degli immunocomplessi) e CD56, che non si trovano nella maggior parte delle cellule T. Quindi, le cellule NK esprimono il fenotipo  $CD3^-$ ,  $CD16^+$ ,  $CD56^+$  e si distinguono dalle cellule T che sono sempre  $CD3^+$  e normalmente  $CD16^-$   $CD56^-$ . Oltre ad essere in grado di determinare la citolisi diretta, la quale è inibita dalle molecole dell'MHC di classe I ed è stimolata dalla loro assenza (Ljunggren H- G et al; 1990) (Fig. 7 – B), le cellule NK possono uccidere anche cellule rivestite da anticorpi. Questa citotossicità cellula-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) richiede il legame della porzione Fc dell'anticorpo al recettore dell'Fc presente sulla superficie delle cellule NK, il CD16, che a sua volta è in grado di attivare l'apparato citolitico. Le cellule NK attivate producono citochine come l'IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e il CSF granulocito-macrofagico che conferisce capacità

immunoregatorie. Inoltre, le citochine prodotte dalle cellule NK modulano l'ematopoiesi e sostengono la produzione di granulociti e macrofagi.



**Figura 7.** Funzione dei NK mediata da segnali di attivazione o inibizione per riconoscimento di una cellula bersaglio mediante l'identificazione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I): A la cellula riconosciuta come non-self, NK rilascia sostanze estranee; B la presenza di MHC I e l'assenza di fattori attivatori determinano il non rilascio dei granuli enzimatici – [www.chimicaonline.it](http://www.chimicaonline.it).

### ***1.5 Terapia con farmaci biologici immunomodulanti nelle neoplasie renali***

Nei pazienti affetti da carcinoma renale metastatico, lo sviluppo di farmaci anti-angiogenetici ha portato ad un importante incremento della sopravvivenza globale dalla diagnosi (Lam JS et al, 2005). Negli ultimi decenni lo studio di alcuni aspetti della biologia molecolare, come fattori di crescita, molecole coinvolte nella traduzione del segnale, angiogenesi, apoptosi, invasività e ciclo

cellulare ha consentito di identificare nuovi bersagli farmacologici in grado di interferire con eventi chiave della trasformazione e proliferazione della cellula neoplastica. Le cellule normali sono influenzate da una varietà di fattori ambientali e dell'ospite tali da produrre mutazioni "prooncogeniche"; ne deriva che da una singola o da una serie di queste mutazioni può risultarne una trasformazione cellulare. Come le cellule normali, la maggior parte delle cellule neoplastiche utilizzano multiple vie di segnale intracellulare al fine di assicurare il mantenimento e l'attività di funzioni critiche per la loro sopravvivenza. Le proteine che quindi preservano la funzione, la sopravvivenza, la proliferazione ed i recettori espressi sulla superficie cellulare possono costituire il bersaglio di una nuova forma di terapia mirata. Le nuove linee di ricerca farmacologica si sono quindi rivolte alla identificazione di agenti (terapia target) in grado di interferire in maniera selettiva contro bersagli molecolari specifici al fine di aumentare la selettività del bersaglio e di ridurre gli effetti collaterali sistemici. Per il trattamento del carcinoma renale metastatico, la lista di agenti a bersaglio molecolare comprende:

- **Tirosina chinasi inibitori** come:

- a) Sunitinib: ha attività contro i recettori per il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) e il fattore di crescita

dell'endotelio vascolare (VEGF). È usato nei pazienti che sono intolleranti o diventano resistenti a imatinib;

- b) Sorafenib: inibitore multispecifico della tirosin-chinasi, disponibile per via orale, con attività contro i recettori 1, 2 e 3 dei fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e contro il recettore del fattore di crescita dei derivati piastrinici (PDGF) e diverse chinasi Raf;
- c) Pazopanib: inibisce più potentemente i recettori tirosin-chinasi del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) 1, 2 e 3 che sono associati alla crescita del tumore e all'angiogenesi. Ha anche attività contro c-KIT, una tirosina chinasi anomala trovata nei tumori stromali gastrointestinali, e il recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF);
- d) Tivozanib: è un VEGF-TKI con elevata selettività per i recettori VEGF 1-3;
- e) Axitinib: attività contro i recettori per il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), contro c-KIT e il recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF);
- f) Lenvatinib: con attività contro il recettore del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGFR) 1, 2 e 3 e il fattore di crescita



dei fibroblasti (FGF) 1, 2, 3 e 4, recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR) alfa, cKit e il proto-oncogene RET;

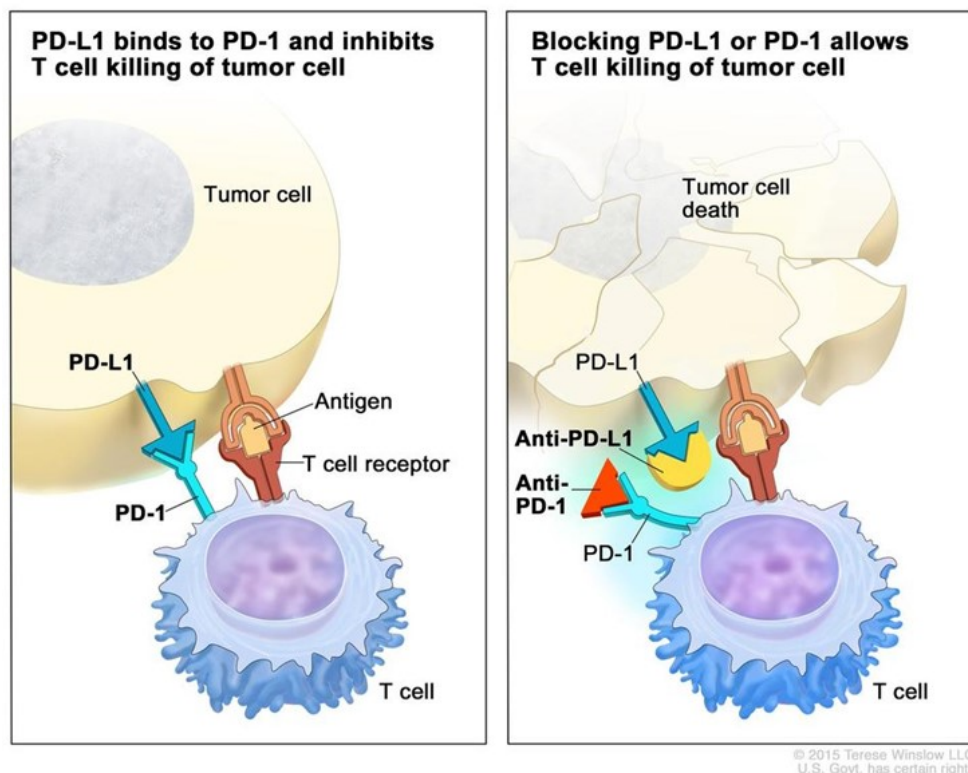
g) Cabozantinib: attività contro il recettore del fattore di crescita degli epatociti (MET), recettore del fattore di crescita endoteliale vascolare 2 (VEGFR-2) e riarrangiato durante la trasfezione (RET).

- **mTOR inibitori:**

a) Everolimus e Temsirolimus: interrompono le vie di segnalazione di diverse citochine e fattori di crescita tra cui IL-2 e provoca una diminuzione della sintesi proteica e dell'arresto del ciclo cellulare.

A ciò si aggiungono gli inibitori degli immuno-checkpoints, comprendenti nivolumab, ipilimumab e pembrolizumab, che hanno dimostrato in varie combinazioni un vantaggio in sopravvivenza nei pazienti affetti da tale patologia (Motzer RJ et al, 2018; Atkins MB et al, 2018; Choueiri TK et al, 2021). Gli immuno-checkpoints sono farmaci che bloccano proteine chiamate checkpoints prodotte da cellule del sistema immunitario, come le cellule T e alcune cellule tumorali. Questi punti di controllo aiutano ad impedire che le risposte immunitarie siano troppe forti e talvolta possono impedire alle cellule

T di uccidere le cellule tumorali. Quando questi punti di controllo sono bloccati, i linfociti T possono uccidere meglio le cellule tumorali. Alcuni esempi di proteine del checkpoint che si trovano sui linfociti T o sulle cellule tumorali sono: PD-1/PD-L1 (Fig. 8) e CTLA-4/B7-1/B7-2.



**Figura 8.** Proteine del checkpoint, come PD-L1 sulle cellule tumorali e PD-1 sulle cellule T, aiutano a mantenere sotto controllo le risposte immunitarie. Pannello di sinistra: Il legame di PD-L1 a PD-1 impedisce alle cellule T di uccidere le cellule tumorali nel corpo; Pannello di destra: Il blocco del legame di PD-L1 a PD-1 con un inibitore del checkpoint immunitario (anti-PD-L1 o anti-PD-1) consente alle cellule T di uccidere le cellule tumorali - [www.nationalcancerinstitute.com](http://www.nationalcancerinstitute.com)

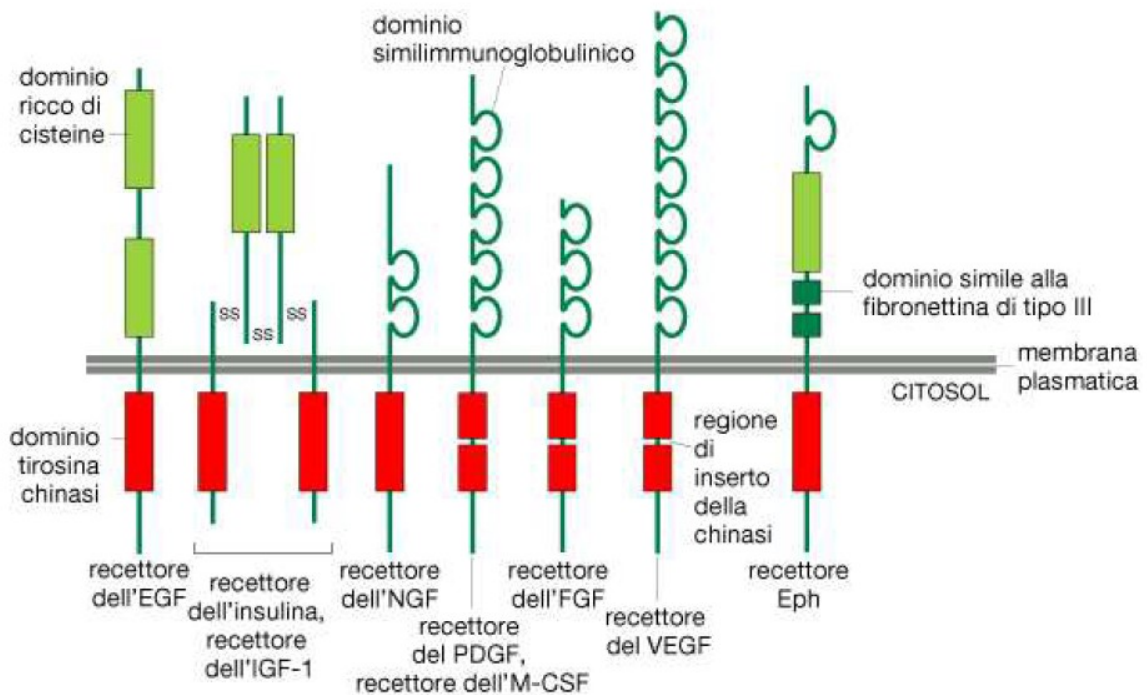
Sebbene le immuno-combinazioni rappresentino una svolta fondamentale nel trattamento di questi pazienti, permane una quota del 10-15% di pazienti primary refractory (Motzer RJ et al, 2018; Atkins MB et al, 2018; Choueiri TK

et al, 2021), ovvero in progressione clinica e/o strumentale alla prima rivalutazione prevista intorno alle 12 settimane. Vi è inoltre una quota stimata intorno al 10% di pazienti che va incontro a remissione completa (Motzer RJ et al, 2018; Atkins MB et al, 2018; Choueiri TK et al, 2021).

### ***1.5.1. Tirosin chinasi inibitori***

Gli inibitori della tirosina chinasi (TKI) sono un gruppo di agenti farmacologici che interrompono le vie di trasduzione del segnale delle protein chinasi mediante diverse modalità di inibizione. L'interesse per gli inibitori delle protein chinasi è iniziato con l'approvazione della FDA dell'inibitore della TKI, Imatinib nel 2001. Imatinib è un farmaco chemioterapico orale progettato per colpire la proteina ibrida BCR-Abl, una proteina di segnalazione della tirosin chinasi prodotta in pazienti con cromosoma Philadelphia, affetti da Leucemia Mieloide Cronica. Dall'introduzione del farmaco, l'applicazione dei TKI è stata in continua espansione, in particolare per il trattamento del cancro a causa dei ruoli critici delle tirosin chinasi nella segnalazione cellulare (Manning G et al, 2002; Wu P et al, 2015). Gli enzimi tirosin chinasi (TKs) possono essere classificati in: recettori tirosin chinasi (RTKs), tirosin chinasi non recettoriali (NRTKs) e un piccolo gruppo di chinasi a doppia specificità (DSK) che possono fosforilare serina, treonina e residui di tirosina. Gli RTK sono recettori transmembrana che includono i recettori del fattore di crescita endoteliale

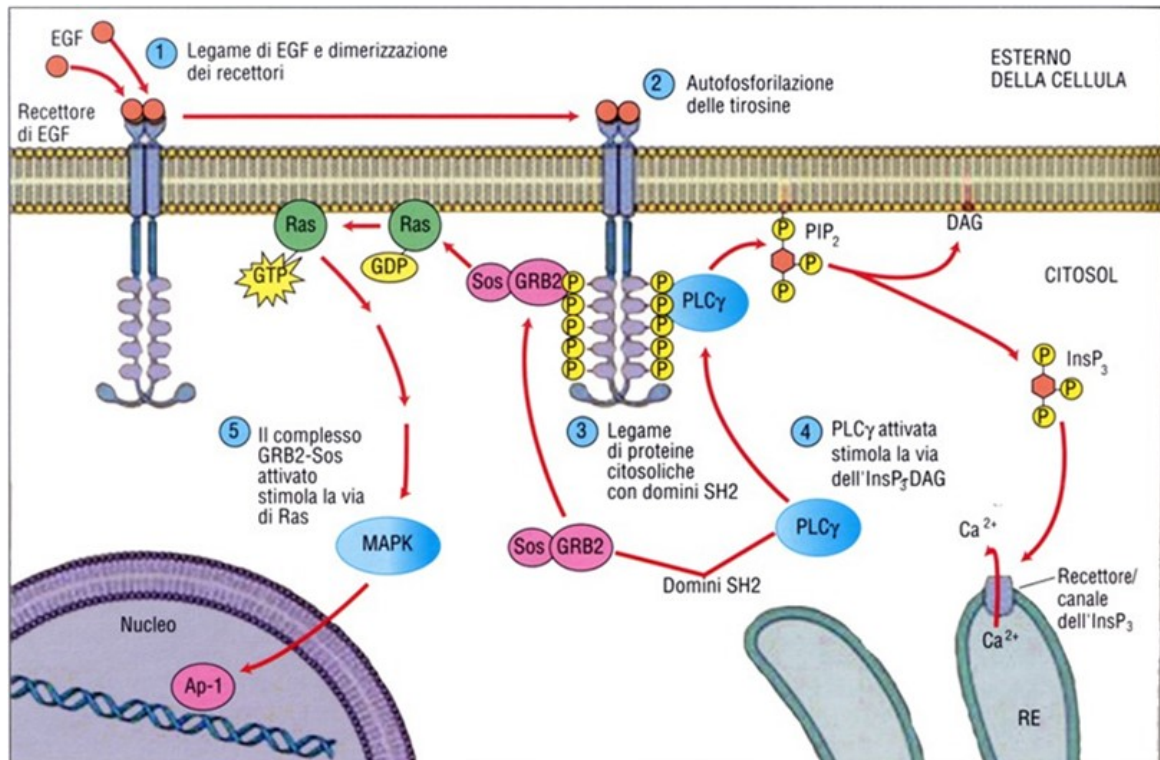
vascolare (VEGFR), i recettori del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR), la famiglia del recettore dell'insulina (InsR) e la famiglia del recettore ErbB che include i recettori del fattore di crescita epidermico (EGFR) e il recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano (HER2). (Fig. 9).



**Figura9.** Recettori con attività tirosin chinasi: [www.dbcf.unisi.it](http://www.dbcf.unisi.it).

Nel complesso, le tirosin chinasi fosforilano amminoacidi specifici su enzimi substrato, che successivamente alterano la trasduzione del segnale portando a cambiamenti a valle nella biologia cellulare. La trasduzione del segnale innescata dai TK può modificare la crescita cellulare, la migrazione, la

differenziazione e l'apoptosi (Fig. 10). Pertanto, il blocco di questi segnali iniziali tramite TKI può prevenire l'azione aberrante dei TK mutati o disfunzionali (Jiao Q et al, 2018; Kolibaba KS et al, 1997).



**Figura 10.** Esempio delle vie di trasduzione associate a recettori per fattori di crescita:  
[www.medicinapertutti.it](http://www.medicinapertutti.it)

Nonostante le diverse sequenze di amminoacidi primari, le chinasi umane condividono strutture simili, in particolare quando si tratta della tasca di legame dell'ATP situata nella regione cataliticamente attiva. Tipicamente viene conservata anche la sequenza amminoacidica iniziale (ASP-Phe-Gly o DFG) dell'anello di attivazione flessibile che controlla l'accesso al sito di attivazione (Tong M et al, 2015). Gli inibitori della chinasi possono essere irreversibili o

reversibili. Gli inibitori irreversibili tendono a legarsi covalentemente bloccando il sito dell'ATP con conseguente inibizione. Gli inibitori reversibili possono ulteriormente suddividersi in quattro sottotipi principali basati sulla conformazione della tasca di legame e del motivo DFG (Wu P et al, 2015; Norman RA et al, 2012):

- Inibitori di tipo I: si legano in modo competitivo al sito di legame dell'ATP dei TK attivi. La disposizione del DFG negli inibitori di tipo I ha il residuo di aspartato rivolto verso il sito catalitico della chinasi;
- Inibitori di tipo II: si legano a chinasi inattive, solitamente nel sito di legame dell'ATP. A causa della rotazione verso l'esterno del motivo DFG, molti inibitori di tipo II possono anche sfruttare regioni adiacenti al sito di legame dell'ATP che altrimenti sarebbero inaccessibili;
- Inibitori di tipo III: si legano esclusivamente alle tasche allosteriche adiacenti alla regione di legame dell'ATP;
- Inibitori di tipo IV: legano siti allosterici lontani dalla tasca di legame dell'ATP.
- Inibitori di tipo V: si riferiscono a un sottoinsieme proposto di inibitori della chinasi che mostrano più modalità di legame.

La tossicità e l'efficacia dei TKI sono spesso strettamente collegate; ciò consente agli effetti tossici mirati di agire come biomarcatori di un'efficace

inibizione farmacologica per determinati TKI. Ad esempio, le eruzioni cutanee possono fungere da meccanismo di monitoraggio per gli effetti di alcuni TKI che prendono di mira l'EGFR e l'ipertensione e possono generalmente aiutare a monitorare l'inibizione del VEGFR (Petrelli F et al, 2012; Estfan B et al, 2013; Hamnvik OP et al, 2015). Tuttavia, gli effetti dannosi combinati delle tossicità sia on-target che off-target possono diminuire la qualità della vita di un paziente e limitare l'intensità della dose del farmaco, portando a un trattamento sub-terapeutico. Mentre i TIK vengono somministrati principalmente a una dose fissa, diversi fattori devono guidare il dosaggio quando si elabora un regime TKI ottimale. Questi fattori includono interazioni farmaco-farmaco/cibo-farmaco, polimorfismi genetici dei trasportatori ABC, aderenza del paziente, assorbimento intestinale, distribuzione, metabolismo ed eliminazione (Klumpen HJ et al, 2011; Terada T et al, 2015).

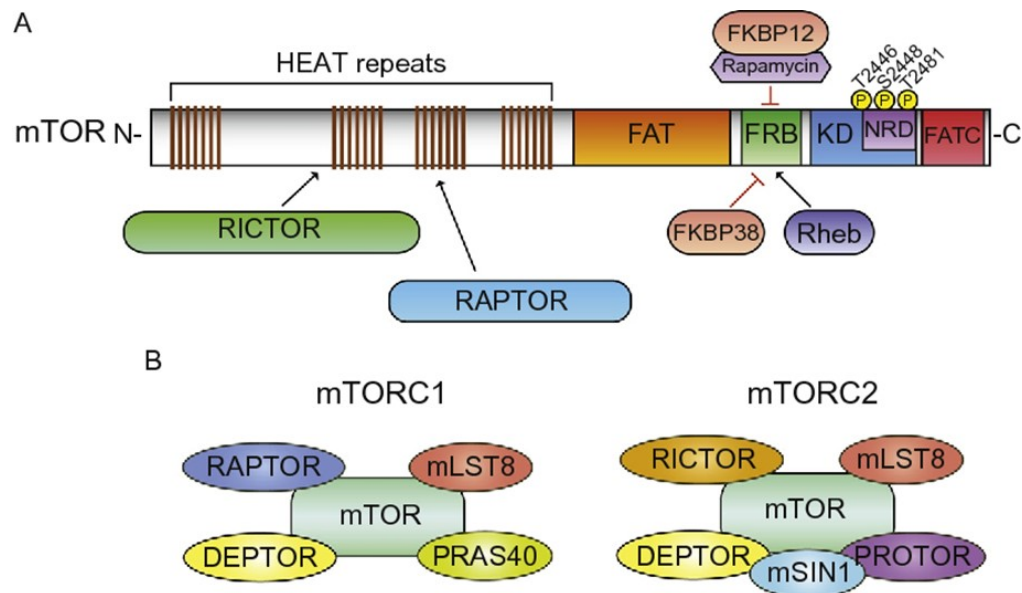
### ***1.5.2. mTOR inibitori***

mTOR, acronimo di Mammalian Target of Rapamycin, bersaglio della rapamicina dei mammiferi, è una protein-chinasi a doppia specificità che fosforila serina/treonina e residui di tirosina (Yin Y et al, 2016). È considerata una protein-chinasi atipica appartenente alla famiglia delle chinasi legate a

PI3K, fosfoinositide 3-chinasi (Saxton RA et al, 2017). Ha ruoli critici in diversi processi biologici, come la proliferazione cellulare, la sopravvivenza, l'autofagia, metabolismo e immunità. L'mTOR umano contiene 2549 aminoacidi che formano diversi domini tra cui il dominio NH<sub>2</sub>-terminale HEAT (N-HEAT), dominio FAT (FRAP-ATM-TRAAP), dominio di legame FKBP12- rapamicina (FRB), dominio regolatorio negativo (NRD), dominio della chinasi (KD), dominio FATC (FRAP, ATM,TRAAP C-terminale) (Fig.11 – A). mTOR forma distinti complessi di segnalazione: complesso mTOR 1 (mTORC1), il complesso mTOR 2 (mTORC2) e un presunto complesso mTOR 3 (mTORC3) (Saxton RA et al, 2017; Harwood FC et al, 2018). mTOR con la proteina SEC13 8 (mLST8) sono membri comuni sia di mTORC1 che di mTORC2. Proteina associata alla regolazione di mTOR (raptor), il substrato Akt ricco di prolina 40 kDa (PRAS40) e la proteina 6 contenente il dominio DEP (DEPTOR) sono membri specifici di mTORC (Yin Y et al, 2016; Saxton RA et al, 2017). Invece, il compagno insensibile alla rapamicina di mTOR (rictor) e la proteina 1 che interagisce con la proteina chinasi attivata dallo stress nei mammiferi (mSIN1 o MAPKAP1) sono componenti unici in mTORC2 (Yin Y et al, 2016) (Fig.11 – B). mTORC3 è costituito da ETV7, mTOR e altri componenti non definiti (Harwood FC et al, 2018). mTORC1 rileva i nutrienti, i fattori di crescita e l'energia cellulare per



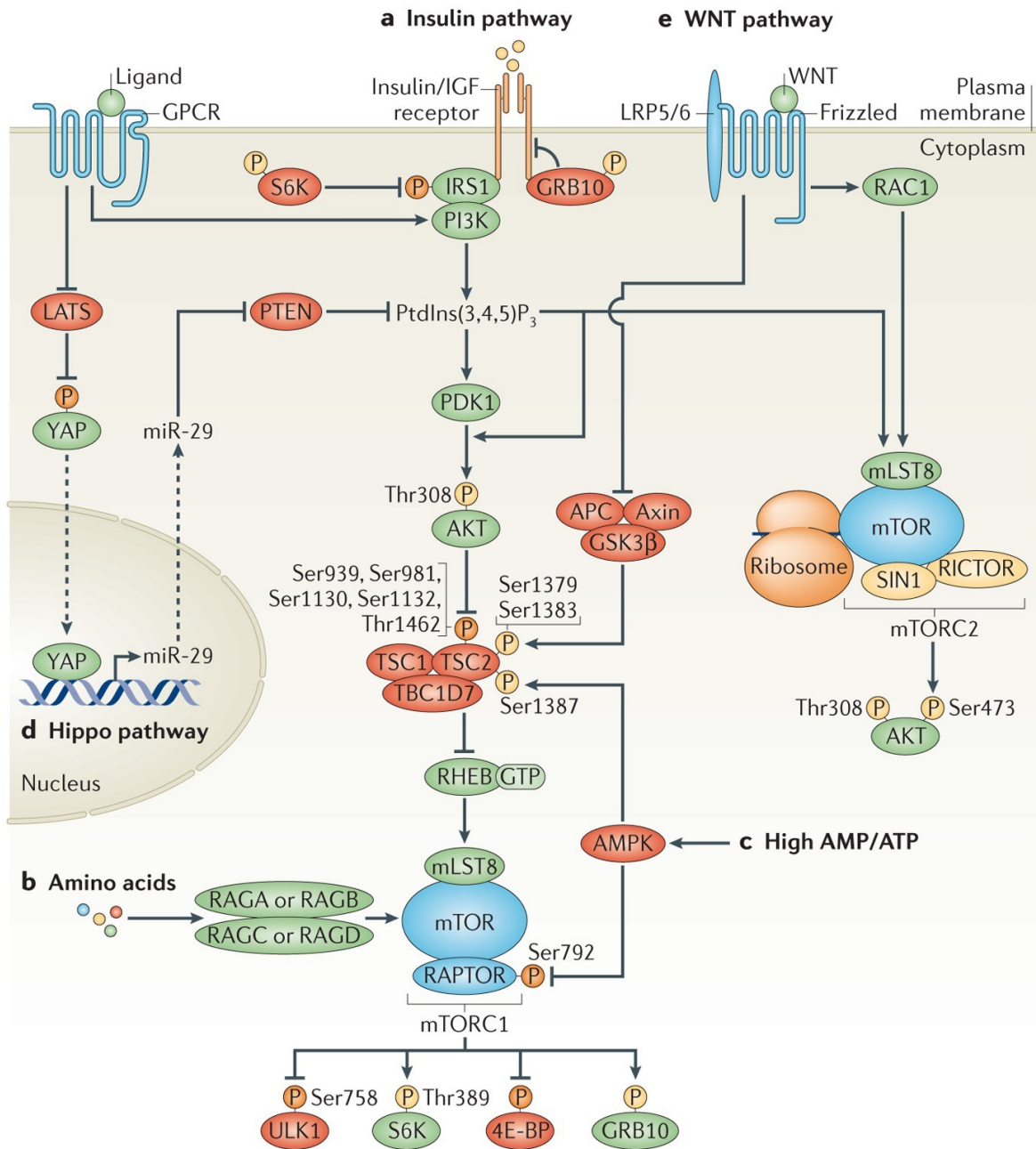
orchestrare la sintesi di nucleotidi, lipidi e proteine, per inibire l'autofagia e per stimolare la crescita cellulare (Saxton RA et al, 2017). mTORC2 non è solo regolato da fattori di crescita, ma attiva anche il recettore del fattore di crescita insulino-simile di tipo I (IGF-IR) e il recettore dell'insulina (InsR) attraverso l'attività tirosina chinasi di mTOR (Yin Y et al, 2016). Inoltre, mTORC2 regola la polarizzazione dell'actina e l'endocitosi (Jacinto E et al, 2004; Rispal D et al 2015).



**Figura 11:** "Ruolo dei complessi mTOR nella regolazione della massa cellulare  $\beta$  del pancreas" A: domini strutturali mTOR inclusi i residui di fosforilazione, regioni per il legame RAPTOR o RICTOR nonché per l'interazione rapamicina e Rheb. Le abbreviazioni utilizzate sono le seguenti: HEAT repeats (huntingtin, fattore di allungamento 3, subunità alfa-regolatrice della proteina fosfatasi 2A e TOR1); dominio FAT (FRAP-ATM-TRAAP); dominio di legame FKBP12-rapamicina (FRB); dominio regolatorio negativo (NRD); dominio della chinasi (KD); Dominio FATC (FRAP, ATM, TRRAP C-terminale); B: composizione dei complessi mTORC1 e mTORC2 (Vitamins and hormones, Volume 95, 2014, pp. 425-469 A Bartolomé, C. Guillén) – [www.semanticscholar.org](http://www.semanticscholar.org).

L'attività di mTOR è frequentemente deregolata in una varietà di tumori umani, come il carcinoma mammario, prostatico, polmonare, epatico e renale. La

sovraregolazione della segnalazione di mTOR può promuovere la crescita e la progressione del tumore attraverso diversi meccanismi tra cui la promozione della segnalazione del recettore del fattore di crescita, l'angiogenesi, il metabolismo glicolitico, il metabolismo lipidico, la migrazione delle cellule tumorali e la soppressione dell'autofagia (Yin Y et al, 2016). L'attivazione aberrante di mTOR nel cancro umano può essere attribuita a mutazioni che attivano il percorso di mTOR, amplificazione o sovraespressione dei componenti dei complessi, mutazioni o perdita di regolatori negativi di mTOR. Le mutazioni PIK3CA sono frequentemente rilevate nel cancro umano. L'attivazione di PI3K promuove l'attivazione sia di mTORC1 che di mTORC2 (Fig. 12). Inoltre, mutazioni in geni KRAS (acronimo di Kirsten rat sarcoma) e BRAF (B-Raf) possono portare all'attivazione di mTORC1. In particolare, KRAS può legarsi direttamente a PIK3CA (p110 $\alpha$ ) e attivare la via PI3K, portando all'attivazione di mTOR (Rodriguez-Viciano P et al, 1994). L'attivazione di mutazioni in mTOR, spesso osservate nel cancro al rene, può provocare un'iperattivazione di mTOR indipendente da RAG e RHEB, quindi perdita della dipendenza da fattori di crescita e amminoacidi (Xu J et al, 2016). Dato che mTOR ha ruoli critici nella progressione del tumore, gli inibitori di mTOR sono promettenti nella terapia del cancro.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figura 12.** A monte di mTOR: input classici. (Making new contacts: the mTOR Network in metabolism and signalling crosstalk:2014. M Shimobayashi e M N.Hall., Biology, Medicine Nature Reviews Molecular Cell Biology ) - www.nature.com

## **Capitolo primo**

### **SCOPO TESI**

Lo studio osservazionale e non interventistico è focalizzato all'analisi delle diverse sottopopolazioni linfocitarie T, B e Natural Killer (NK) in pazienti affetti da carcinoma renale metastatico trattati in I linea con immunocombinazione. Prevede che l'analisi venga svolta al basale (T0) ed a 3 mesi dall'inizio del trattamento (T1). Verrà inoltre analizzato l'infiltrato tumorale mediante immunohistochimica ed il profilo genetico della neoplasia. Successivamente, i dati sulle diverse sottopopolazioni linfocitarie e le eventuali variazioni registrate tra il tempo T0 e T1, così come i dati ottenuti mediante immunohistochimica ed analisi delle gene signatures presenti, verranno correlati con la risposta tumorale in termini di Response Rate e Progression Free Survival (PFS) e con i dati riguardanti le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti inclusi, con lo scopo di identificare eventuali fattori predittivi/prognostici che consentano di ottimizzare la gestione terapeutica dei pazienti affetti da carcinoma renale avanzato. Il mio lavoro di analisi si soffermerà nello specifico sullo studio delle sottopopolazioni linfocitarie T, B e NK circolanti.

## Capitolo secondo

### MATERIALI E METODI

#### *2.1. Campioni in esame (criteri d'inclusione-esclusione)*

Il lavoro di tesi include pazienti con carcinoma renale a cellule chiare e non chiare metastatico provenienti dalle Unità Operative di Oncologia degli ospedali di Macerata e Fermo. Gli stessi pazienti rientrano in un protocollo di uno studio multicentrico denominato "POP-R" che raccoglie in un ampio database tutti i dati clinici relativi a centinaia di pazienti con carcinoma renale, trattati con vari tipi di immuno-combinazione (pembrulizumab/axitinib, nivolumab /ipilimumab o nivolumab/cabozantinib), provenienti da centri oncologici distribuiti su 130 nazioni in tutto il mondo. I nostri pazienti, nello specifico, sono stati tratti tutti con l'immuno-combinazione pembrulizumab e axitinib e sono stati arruolati prendendo in considerazione i seguenti criteri di inclusione ed esclusione.

I criteri d'inclusione comprendono:

1. Pazienti di età maggiore di 18 anni;
2. Diagnosi istologica o citologica di carcinoma renale a cellule chiare o non a cellule chiare;

3. Diagnosi di malattia metastatica non resecabile e misurabile radiologicamente;
4. Trattamento di I linea con la combinazione di pembrolizumab/axitinib,  
I criteri d'esclusione si riferiscono a:
  1. Malattia non misurabile radiologicamente;
  2. Pazienti affetti da carcinoma renale metastatico trattati con immunocombinazioni in linee successive alla prima.

## ***2.2. Trattamento campione***

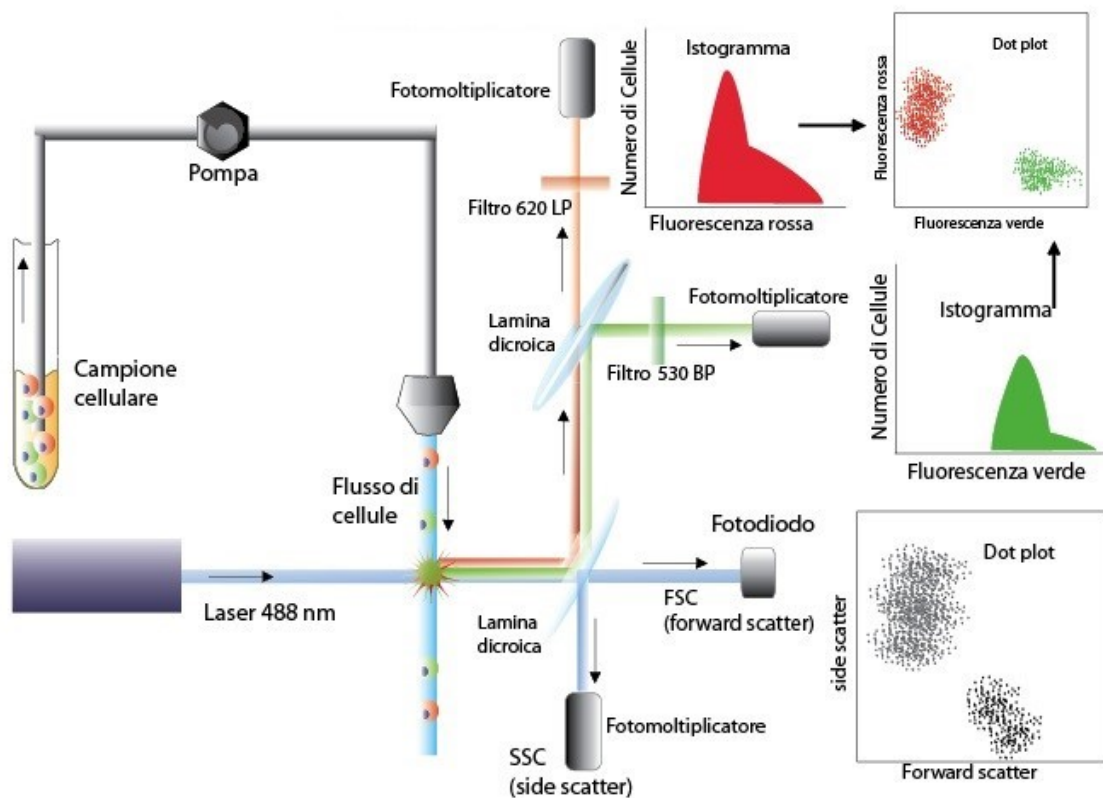
Lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie viene realizzato mediante Citometria a Flusso Multicolore (FCM), utilizzando una mix di anticorpi coniugati con fluorocromi su campioni di sangue periferico. Gli anticorpi monoclonali (ed i fluorocromi) utilizzati per la marcatura degli antigeni della superficie cellulare sono di seguito specificati: anti-CD3(FITC), anti-CD16/CD56 (PE), anti-CD45 (PerCP-Cy5.5), anti-CD4 (PE-Cy7), anti-CD19 (APC), anti-CD8 (APC-Cy7); tutti gli anticorpi suddetti sono stati forniti dalla ditta BD Biosciences, (San Jose, CA, USA). La procedura operativa prevede l'utilizzo di provette specifiche, contenenti un pellet liofilizzato di biglie fluorescenti a titolo noto, in cui si miscelano 50 microlitri ( $\mu\text{L}$ ) di sangue intero anticoagulato con EDTA e 20 microlitri ( $\mu\text{L}$ ) della mix di anticorpi

monoclonali, come sopra specificati. Si lascia incubare al buio e a temperatura ambiente (20°C-25°C) per 15 minuti. Al termine dell'incubazione, si effettua la lisi dei globuli rossi aggiungendo alla provetta di reazione 450 microlitri (µL) di Soluzione Lisante (diluita 1:10 con acqua deionizzata) e facendo incubare al buio e a temperatura ambiente (20°C-25°C) per 10 minuti. Terminata la lisi eritrocitaria, si procede con l'acquisizione di almeno 10,000 eventi al citofluorimetro. I campioni acquisiti vengono analizzati mediante software dedicato, che fornisce i valori percentuali e assoluti dei linfociti T (CD3+), B (CD19+), NK (CD16/CD56+), nonché il rapporto tra T-helper (CD4+) e T-citotossici/suppressor (CD8+).

### ***2.3. Citofluorimetro: cenni storici e caratteristiche***

L'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie viene eseguito mediante Citometria a Flusso Multicolore (FCM). La citofluorimetria è una tecnica che si sviluppa alla fine degli anni Sessanta ma si diffonde solo quando vengono distribuiti sul mercato i primi citometri e cioè all'inizio degli anni Settanta. In seguito, la citofluorimetria ha compiuto molti passi avanti grazie all'utilizzo di nuovi fluorocromi e di un numero maggiore di sorgenti di eccitazione. Questi progressi hanno reso possibile la stima del numero assoluto di cellule, del contenuto di DNA e RNA, la determinazione degli antigeni di superficie,

intracitoplasmatici e nucleari. Il citofluorimetro è uno strumento che si compone di più parti: un sistema fluidico, un sistema di eccitazione, un sistema di componenti elettronici necessari per acquisire il segnale ed un software per analizzare i dati (Valtriani C et al, 1997) (Fig. 13).

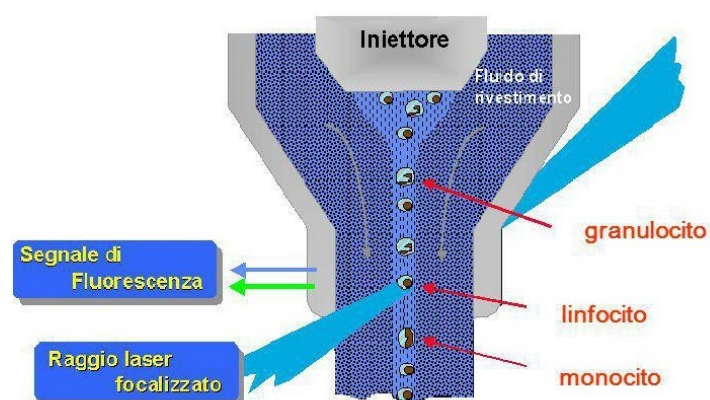


**Figura13.** Schema di citometria a flusso – [www.biologa.altervista.org](http://www.biologa.altervista.org)

Il sistema fluidico è essenziale per allineare le particelle da analizzare cosicché possano passare attraverso il punto di intersezione con il raggio di luce. Il sistema di distribuzione veicola la sospensione cellulare in direzione della camera di flusso, dove viene iniettata in un tubo capillare. A questo livello, si



realizza la “focalizzazione idrodinamica”, che consente la disposizione delle particelle da analizzare in fila al centro del flusso (Fig. 14). È fondamentale che nel capillare vi sia un flusso laminare anziché turbolento; in questo modo, le forze inerziali idrodinamiche agiscono conservando la posizione delle particelle al centro del capillare e di conseguenza, danno origine a due flussi coassiali. Il flusso interno (core flow) racchiude le particelle da analizzare mentre il flusso esterno (sheath fluid), le mantiene lungo l’asse ideale di flusso. Per calibrare la velocità di flusso (flow rate) delle particelle all’interno del capillare, si può moderare la differenza di pressione tra core flow e sheath fluid. La velocità di flusso viene generalmente misurata in numero di eventi al secondo; valore che equivale al numero di particelle che hanno incrociato il raggio luminoso nell’unità di tempo. Per permettere il corretto svolgimento della focalizzazione idrodinamica, è necessario impedire che si creino aggregati, filtrando o diluendo in maniera opportuna il campione da esaminare.



**Figura 14.** Cella di flusso: Basi della citofluorimetria a flusso di Giannino Guarino,2014 – [www.slideplayer.it](http://www.slideplayer.it)

Il sistema di eccitazione è formato da una sorgente luminosa, direzionata nella camera di misura per mezzo di fibre ottiche. Normalmente viene impiegata una sorgente luminosa a ioni Argon a lunghezza d'onda di 488 nm, con emissione nello spettro di lunghezza d'onda correlativo al blu. Questa fonte luminosa permette di misurare in maniera accurata i parametri fisici e contemporaneamente, di eccitare numerosi fluorocromi. È possibile incorporare altri laser così da avere a disposizione altre lunghezze d'onda di eccitazione. Infatti, ad ogni fluorocromo è associata una particolare banda di lunghezza d'onda per l'eccitazione e l'emissione. Di conseguenza, la lunghezza d'onda della sorgente di eccitazione rappresenta una limitazione rispetto alla valutazione dei fluorocromi da utilizzare; perciò, al fine di ampliare il numero di molecole impiegabili, è possibile aggiungere ulteriori sorgenti luminose a lunghezze d'onda differenti. In queste situazioni ci si avvale di laser a vapori di Elio-Neon con lunghezza d'onda di 622 nm ed emissione nel rosso, e laser a lunghezza d'onda di 405 nm con emissione nel viola o laser a UV a 350 nm con emissione nello spettro del visibile. Per acquisire il segnale si adoperano filtri ottici e dicroici, che consentono di separare e canalizzare i segnali luminosi in maniera proporzionale al parametro misurato, ed i fotomoltiplicatori (dispositivi CCD), che raccolgono e convertono i segnali in impulsi elettrici. I filtri dicroici riflettono la luce a 45° così da dirigere il segnale

luminoso verso i diversi fotomoltiplicatori; i filtri ottici consentono il passaggio solo a determinate lunghezze d'onda relative alle emissioni di alcuni fluorocromi. Vi sono tre tipi di filtri:

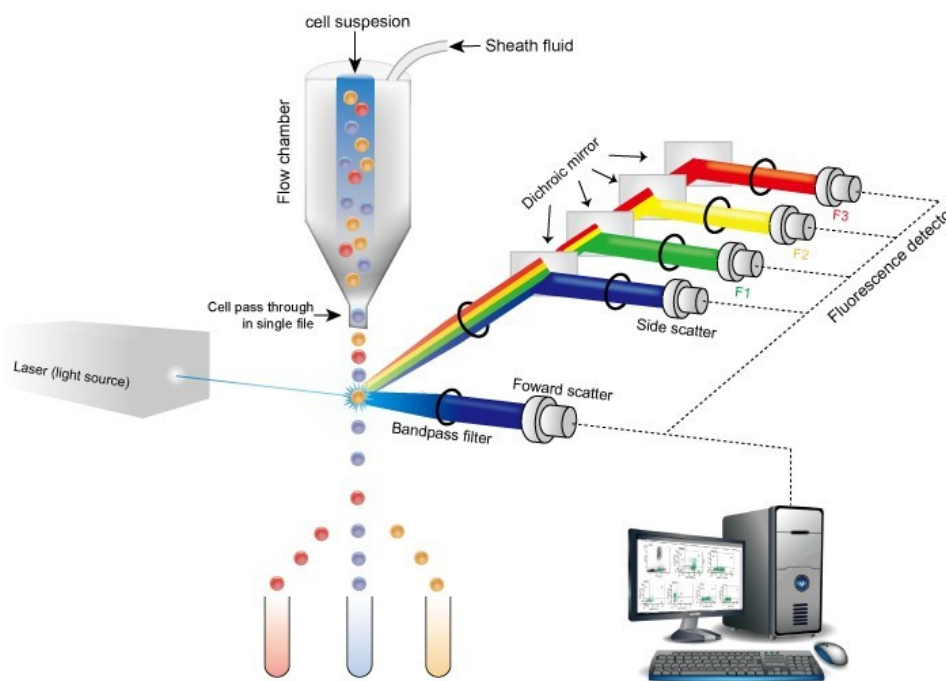
- Filtri Long pass, i quali trasmettono solamente lunghezze d'onda maggiori di un precisato valore del filtro;
- Filtri Short pass che trasmettono solo lunghezze d'onda minori rispetto al valore proprio del filtro;
- Filtri Band pass che trasmettono lunghezze d'onda racchiuse in un intervallo abbastanza limitato e riflettono lunghezze d'onda maggiori e minori.

I segnali luminosi diffusi dalle particelle che si stanno analizzando, sono frazionati e direzionati verso i fotomoltiplicatori che li convertono in impulsi elettrici. Gli impulsi devono essere ulteriormente amplificati o in determinate circostanze devono essere ridotti. Una volta che gli impulsi elettrici hanno subito delle variazioni, vengono digitalizzati da un convertitore analogico-digitale ed interpretati da un software apposito. Ciascun valore amplificato e digitalizzato, rappresenta un evento dell'esperimento. Dalla raccolta del segnale si originano dati che vengono conservati da software specifici, i quali forniscono una rappresentazione grafica dei dati stessi. Tra l'altro, questi software possono generare elaborazioni statistiche piuttosto articolate. La

cellula o la particella che viene raggiunta dal fascio luminoso, emana segnali di luce in relazione alle sue caratteristiche fisiche e morfologiche, sulla base di fenomeni di rifrazione, riflessione e diffrazione. Quando il fascio di luce interagisce con le particelle, produce tre segnali che vengono rilevati da differenti sensori. La luce che si dissolve lungo l'asse del fascio luminoso, causata dalla diffrazione frontale, è connessa alla grandezza delle cellule e viene individuata da un sensore localizzato di fronte al fascio incidente (forward scatter FSC). La luce identificata perpendicolarmente a  $90^\circ$  (side scatter SSC) viene prodotta da fenomeni di rifrazione e riflessione ed è indicativa della complessità interna della cellula. Perciò fornisce informazioni circa la densità della cromatina nucleare, il rapporto nucleo-citoplasma, la forma del nucleo, la granularità citoplasmatica ed altre caratteristiche. Sempre nella posizione perpendicolare a  $90^\circ$  viene riconosciuto tramite l'impiego di specifici sensori, un potenziale segnale di fluorescenza, prodotta da fluorocromi che marcano ligandi o che legano direttamente, in maniera stechiometrica, specifiche sostanze (Fig. 15). Ad oggi i citofluorimetri sono in grado di differenziare fino ad un totale di dieci fluorescenze servendosi di più sensori. Al presente, sono impiegati in misura maggiore anticorpi monoclonali marcati da fluorocromi; questi sono utili ad individuare svariate molecole presenti sulla membrana delle cellule o nel citoplasma. Tra i fluorocromi più

diffusi vi è la Fluoresceina isotiocianato (FITC), adatta per l'eccitazione a 488 nm e caratterizzata da uno spettro di emissione nel verde a 520 nm. La Ficoeritrina (PE) viene eccitata alla stessa lunghezza d'onda del FITC, tuttavia si differenzia da questa per lo spettro di emissione nel rosso a 610 nm. L'Allofocianina (APC), viene eccitata a 650 nm e registra un'emissione massima a 770 nm. Oltre a questi fluorocromi di uso comune, più recentemente, sono stati introdotti i cosiddetti "fluorocromi tandem", formati da due molecole con proprietà fotofisiche complementari. Il funzionamento dei "fluorocromi tandem" si basa sul principio di trasferimento dell'energia da una molecola (donatore) ad un'altra (accettore); consiste in una interazione tra due differenti fluorocromi in cui lo spettro di emissione del donatore coincide con la regione di eccitazione dell'accettore. Tra i "fluorocromi tandem", quelli maggiormente sfruttati sono la Ficoeritrina/Cianina 5 (PE/Cy5) e il Peridinin-chlorophyll II protein complex (PerPC) che ha un ampio spettro di eccitazione (tra 430 e 550 nm) e un massimo di emissione a 675 nm. Con l'incremento dei fluorocromi di cui ci si può avvalere, si sono sviluppate positivamente anche le performance di analisi degli strumenti i quali, al massimo delle loro possibilità, sono capaci di caratterizzare allo stesso tempo dodici parametri. Per contro, lo schieramento simultaneo di diversi fluorocromi potrebbe generare la sovrapposizione involontaria degli spettri di emissione di certe fluorescenze. Per questo motivo,

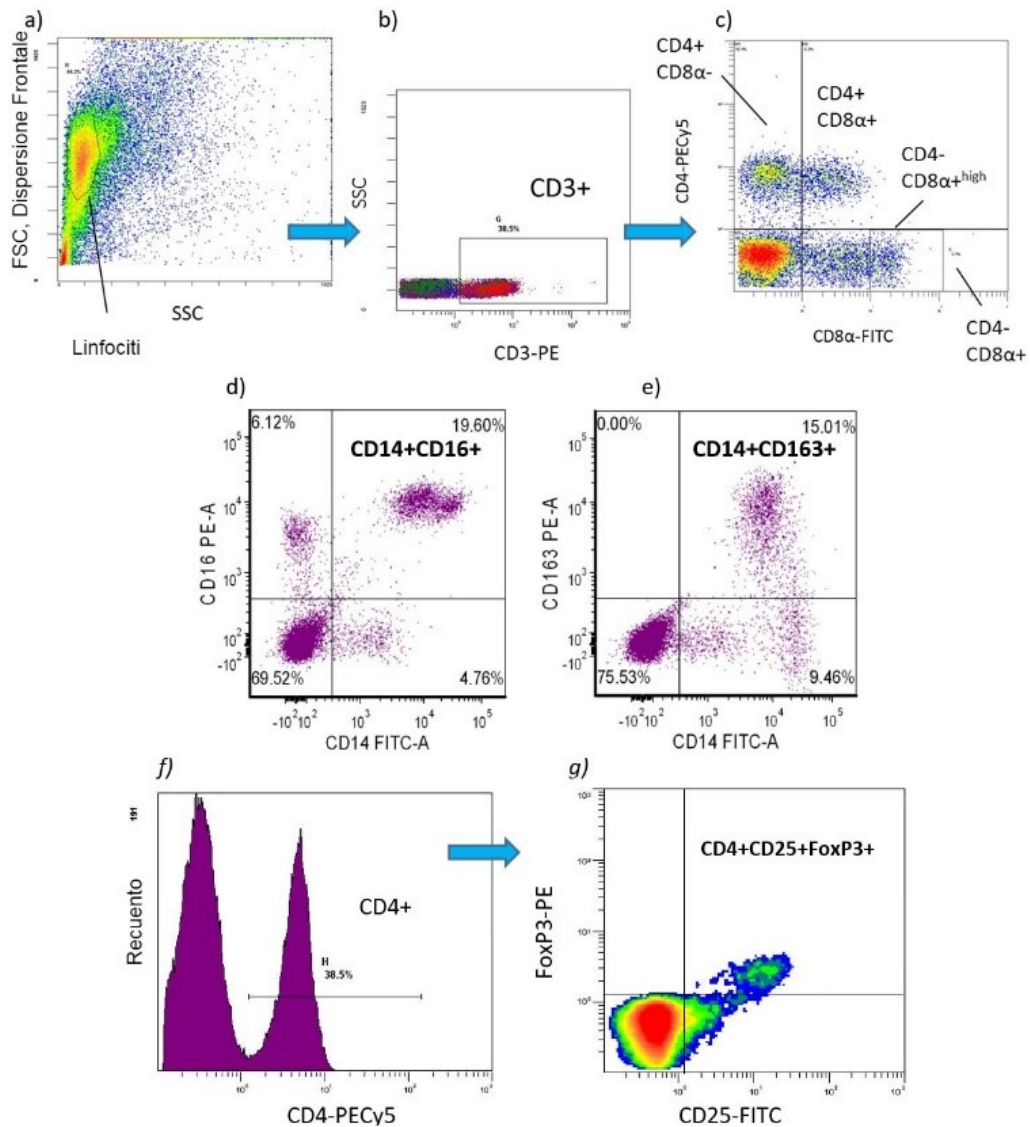
in corso di diagnosi o in ambito sperimentale, è essenziale vagliare accuratamente le proprietà dei fluorocromi impiegati, con l'obiettivo di optare per molecole con lunghezze d'onda di emissione abbastanza dissimili tra loro. Questo consente al citofluorimetro di distinguere agevolmente le lunghezze d'onda, per mezzo dei filtri ottici e di valutarle quantitativamente attraverso uno specifico fotomoltiplicatore. L'attenta scelta dei fluorocromi non può tuttavia escludere completamente il rischio di una sovrapposizione delle lunghezze d'onda. A questo scopo si può utilizzare un sistema di correzione elettronica, noto come "compensazione", il quale è efficace nel sottrarre elettronicamente da un certo canale una quantità standard di segnale aspecifico, corrispondente ad un altro canale.



**Figura 15.** Sistema ottico citofluorimetro - [www.differbetween.com](http://www.differbetween.com)

Il modo migliore per rappresentare graficamente i dati raccolti nell'analisi citofluorimetrica consiste nell'utilizzare diagrammi monodimensionali o istogrammi, in cui gli eventi sono collocati in un diagramma di distribuzione. Nell'asse delle ascisse sono inseriti i dati relativi ai parametri fisici o di fluorescenza mentre, nell'asse delle ordinate viene riportato il numero di eventi (cellule o particelle che si stanno esaminando). La valutazione statistica dei dati si incentra sulla disposizione dei cursori a circoscrivere le aree di interesse e sulla determinazione degli eventi corrispondenti a queste aree. Un altro sistema per riprodurre graficamente i dati raccolti è l'uso di diagrammi bidimensionali, questi consentono di confrontare tra loro parametri fisici e di fluorescenza. Dunque, per rendere intuitiva la visualizzazione dei dati, questi sono organizzati in un diagramma noto come "dot plot", in cui ciascun punto equivale ad un evento al quale è associato un certo valore per ogni parametro misurato (Fig. 16). Più recentemente sono stati creati altri diagrammi, specifici per ogni software di analisi, tra questi vi è il counter-plot, anche detto "diagramma a contorni" che mette in evidenza aree caratterizzate dalla medesima densità di eventi, tramite linee concentriche. La citofluorimetria è una tecnica molto complessa, che consente l'analisi di molteplici parametri relativi ad ogni singolo componente della popolazione in esame. I dati ottenuti

da questa analisi devono essere interpretati con accuratezza e ciò richiede un criterio sistematico.



**Figura16.** Rappresentazione grafica risultati: a-c) Sub-popolazioni di linfociti T: CD3+CD4+CD8- = Linfociti T helper (Th) CD3+CD4+CD8+ = cellule T di memoria CD3+CD4-CD8+ = linfociti T citotossici (CTL) d-e) sub-popolazioni di monociti pro infiammatori: CD172+CD14+CD16+ CD172+CD16+CD163+ CD172+CD14+CD163+ f-g) CD4+CD25+FoxP3+ = linfociti T regolatori (Tregs) - [www.3tre3.it](http://www.3tre3.it)

Dunque, i software rappresentano una componente essenziale del procedimento, in quanto permettono la distinzione delle singole popolazioni



osservate, fenomeno noto come “gating”. Il “gating” è necessario per isolare determinate sottopopolazioni di cellule sulla base dei parametri selezionati e per analizzare ulteriori proprietà che, potrebbero risultare schermate dalla sovrapposizione con le altre sottopopolazioni. Normalmente con l’analisi citofluorimetrica si determina la quantità delle popolazioni che costituiscono il campione mediante valori percentuali; tuttavia si può anche effettuare la conta assoluta delle cellule contenute in 1 mmc di campione. A questo scopo sono state ideate varie metodiche che prevedono l’impiego di microbiglie fluorescenti, a concentrazione nota, che vengono combinate ad un volume precisato del campione da analizzare. Il citofluorimetro (Fig. 17) considera ogni microbiglia come un evento. In questo modo, sapendo il numero effettivo delle microbiglie nel campione, si può dedurre attraverso una proporzione, il numero esatto di cellule o particelle. La citofluorimetria è perciò una tecnica estremamente elaborata e specifica in quanto, consente di valutare varie proprietà di cellule e particelle e di ottenere una stima quantitativa molto accurata. Inoltre, questa metodica può essere applicata ad un elevato numero di cellule senza però intaccare l’esattezza nell’interpretazione dei dati e senza inficiare sulla vitalità delle cellule. Infine, un grande vantaggio di questa metodica è il completamento dell’analisi in tempi brevi (tempi di acquisizione

del campione fino a mille cellule o particelle al secondo). Di contro, l'interpretazione dei dati richiede una certa esperienza da parte dell'operatore.



**Figura 17.** Citofluorimetro laboratorio analisi dell'ospedale di Civitanova Marche.

## Capitolo terzo

### RISULTATI E DISCUSSIONE

Tutti i pazienti con diagnosi di carcinoma renale sono stati avviati a terapia mediante la combinazione pembrolizumab e axitinib. Per ciascun paziente sottoposto allo studio POP-R, sono stati raccolti molteplici dati ma, al fine della tesi, abbiamo preso in considerazione solo determinati parametri, schematizzati nelle seguenti tabelle.

**Tabella A:** Dati generali paziente.

Codice cliente o Iniziali	Centro Oncologico	Data di nascita	SESSO (M=1, F=2)	Fumatore attuale o precedente (1=yes 0=no)	Altezza (cm)	Peso (kg)
YY	Macerata Hospital	08/11/1943	1	0	180	77
UV	Macerata Hospital	02/08/1933	1	0	173	70
SF	Macerata Hospital	16/01/1961	1	0	177	64
ME	Macerata Hospital	16/07/1934	1	0	168	65
ACV	Macerata Hospital	19/07/1943	1	0	160	80
SA	Macerata Hospital	08/04/1957	1	0	170	88
FA	Macerata Hospital	18/04/1952	1	0	183	89
GE	Macerata Hospital	24/11/1944	1	0	165	51
MP	Macerata Hospital	25/01/1948	1	0	167	69
PG	Macerata Hospital	26/09/1957	1	0	178	80
LG	Fermo	03/11/1944	1	1	160	59

FL	Fermo	08/07/1935	1	0	168	68
MM	Fermo	26/01/1953	1	1	182	98

**Tabella B:** Sedi di metastasi in pazienti con carcinoma renale primitivo.

Codice cliente o Iniziali	Metastatico alla diagnosi (1=YES 0=NO)	Data della malattia metastatica	Polmone (YES 1 NO 0)	Osso (YES 1 NO 0)	Fegato (YES 1 NO 0)	Cervello (YES 1 NO 0)	Linfono di mediastinici (YES 1 NO 0)	Linfono di addominali (YES 1 NO 0)	Tessuto molle (YES 1 NO 0)	Altro (per favore specificare)
YY	0	09/04/21	1	0	1	0	0	0	0	0
UV	0	27/05/21	1	0	0	0	0	1	0	0
SF	1	23/12/20	1	0	0	0	0	0	0	0
ME	0	19/03/21	1	1	0	0	0	0	0	0
ACV	0	11/05/21	0	0	0	0	0	1	0	0
SA	1	07/05/21	1	0	1	0	0	1	0	0
FA	1	14/06/21	0	1	0	0	0	0	0	0
GE	0	07/07/21	0	1	0	0	0	0	0	0
MP	1	10/8/21	1	0	0	0	0	0	0	0
PG	0	14/09/21	0	0	0	0	0	0	1	0
LG	1	01/07/21	0	0	0	0	0	0	0	Trombo
FL	0	15/11/21	1	0	0	0	0	0	1	
MM	0	10/12/21	1	0	0	0	0	0	0	Surrene

**Tabella C: Tipizzazione sottopopolazioni linfocitarie a T<sub>0</sub>/T<sub>+3</sub>.**

		CD3%	CD3#	CD4%	CD4#	CD8%	CD8#	CD4/CD8 RATIO	CD19%	CD19#	CD16CD56%	CD16CD56#
YY	T <sub>0</sub>	77	1309	40	691	34	582	1,2	5	94	18	302
	T <sub>+3</sub>	70	1366	33	649	34	658	0,9	5	103	25	488
UV	T <sub>0</sub>	92	1580	33	572	59	1024	0,6	1	23	7	118
	T <sub>+3</sub>	90	1265	28	397	63	881	0,5	1	22	7	98
SF	T <sub>0</sub>	62	944	49	746	11	162	4,6	9	131	29	446
	T <sub>+3</sub>	59	747	47	591	11	133	4,4	9	115	31	397
ME	T <sub>0</sub>	47	229	19	92	28	136	0,7	6	30	47	230
	T <sub>+3</sub>	61	271	28	127	33	147	0,9	5	22	34	153
ACV	T <sub>0</sub>	80	1828	50	1132	30	688	1,7	2	45	18	403
	T <sub>+3</sub>	85	2249	46	1208	40	1053	1,1	3	87	11	304
SA	T <sub>0</sub>	84	917	36	395	43	471	0,8	2	24	11	118
	T <sub>+3</sub>	89	1290	32	471	53	767	0,6	2	26	9	132
LG	T <sub>0</sub>	67	883	47	617	17	227	2,7	3	45	29	389
	T <sub>+3</sub>	73	1342	52	954	19	347	2,7	4	65	23	431
GE	T <sub>0</sub>	93	512	65	360	28	153	2,3	3	17	3	18
	T <sub>+3</sub>	94	409	57	247	37	159	1,6	1	4	4	18
FA	T <sub>0</sub>	83	1870	49	1116	32	735	1,5	7	160	10	230
FL	T <sub>0</sub>	59	608	39	404	17	180	2,2	5	52	36	370

<b>JB</b>	<b>T<sub>0</sub></b>	69	572	35	288	31	260	1,1	8	63	23	193
<b>MP</b>	<b>T<sub>0</sub></b>	86	668	53	412	31	237	1,7	3	26	10	76

**Tabella D: Valori di riferimento tipizzazione linfocitaria**

	<b>Percent</b>	<b>Value/AbsCnt</b>
<b>CD3+</b>	65,0/84,0	1088/2430
<b>CD3+CD8+</b>	20,0/39,0	490/1190
<b>CD3+CD4+</b>	36,0/55,0	760/1370
<b>CD16+CD56+</b>	6,0/18,0	110/330
<b>CD19+</b>	6,0/16	110/390

**Tabella E: Protocollo terapeutico.**

Codice cliente o Iniziali	Terapia immuno-combinata di prima linea	Conta linfocitaria prima della terapia	Data di inizio	Data di fine	Risposta migliore (1 CR, 2 PR, 3 SD, 4 PD)	Progressione (YES=1 NO=0)	Data di progressione
YY	Pembrolizumab + axitinib	1707,90	13/04/2021	28/07/2021	4	1	28/07/2021
UV	Pembrolizumab + axitinib	1721,88	27/05/2021	20/07/2021	2	0	
SF	Pembrolizumab + axitinib	1267,11	10/02/2021	Ongoing	3	0	
ME	Pembrolizumab + axitinib	492,29	13/04/2021	28/12/2021	2	1	28/12/2021
ACV	Pembrolizumab + axitinib	2276,13	15/06/2021	Ongoing	2	0	
SA	Pembrolizumab + axitinib	1089,09	17/05/2021	10/08/2021	2	0	
FA	Pembrolizumab + axitinib	2268,54	10/08/2021	21/09/2021	4	1	21/09/2021
GE	Pembrolizumab + axitinib	551,71	07/09/2021	Ongoing	2	0	
MP	Pembrolizumab + axitinib		23/11/2021	Ongoing	NA	0	
PG	Pembrolizumab + axitinib		07/12/2021	Ongoing	NA	0	
LG	Pembrolizumab + axitinib	1836,94	03/09/2021	Ongoing	2	0	
FL	Pembrolizumab + axitinib		25/11/2021	Ongoing	NA	NA	NA
MM	Pembrolizumab + axitinib		24/1/2022	Ongoing	NA	NA	NA

Segue descrizione dei risultati della conta citometrica del sangue periferico e della tipizzazione delle sottopopolazioni linfocitarie per ciascun paziente che ha completato il primo ciclo di terapia:

- Il paziente YY, 79 anni (Tab. A), giungeva alla diagnosi con metastasi polmonari, epatiche ed ossee (Tab. B). All'emocromo pre-terapia manifestava valori di linfociti nella norma. La tipizzazione delle sottopopolazioni linfocitarie indicava un assetto quantitativo pressoché normali (Tab. C e D). Alla rivalutazione, dopo tre mesi dalla terapia (Tab. E), l'analisi mostrava un lieve aumento nei valori percentuali ed assoluti delle cellule NK oltre ad una riduzione della ratio  $CD4^+/CD8^+$  (Tab. C e D). Dopo la prima infusione di terapia il paziente è deceduto per malattia in progressione (Tab. E).
- Il paziente UV, età 89 anni (Tab. A), si presentava alla diagnosi con metastasi polmonari (Tab. B). L'analisi del sangue pre-terapia rivelava valori di linfociti nella norma. Lo studio delle sottopopolazioni mostrava un incremento nei valori percentuali dei linfociti T e relativa netta riduzione dei linfociti B sia nei valori percentuale ed assoluti; si osservava inoltre una riduzione marcata del rapporto  $CD4^+/CD8^+$  con valori dei  $CD4^+$  sotto la soglia della normalità (Tab. C e D). A tre mesi dalla prima infusione di terapia (Tab. E) si esaminava un calo dei linfociti



totali, comunque entro il range di normalità; a livello di assetto immunologico, benché la ripartizione delle sottopopolazioni T, B, NK, fosse stabile, si celava un ulteriore netto calo del rapporto linfociti helper/citotossici con valori assoluti di CD4<sup>+</sup> particolarmente basso (Tab. C e D). Clinicamente il paziente mostra una remissione parziale di malattia; tuttavia presentava complicanze dovuta alla tossicità causata dalla terapia (Tab. E).

- Il paziente SF, età 61 anni (Tab. A), presentava alla diagnosi metastasi polmonari (Tab. B) e all'esame emocromocitometrico mostrava valore assoluto di linfociti nella norma. Lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie pre-terapia evidenziava una lieve riduzione dei linfociti T nei valori percentuali e assoluti e relativo incremento nei valori percentuali e assoluti delle cellule NK; nella norma i linfociti B. Si osservava un netto incremento del rapporto CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Tab.C e D). Alla rivalutazione dopo tre mesi dalla terapia (Tab. E) l'esame emocromocitometrico mostrava un calo nei valori assoluti dei linfociti totali rispetto alla prima valutazione, ma con assetto delle sottopopolazioni pressoché invariato (Tab. C e D). A livello clinico si osserva una malattia stabile (Tab. E).

- Il paziente ME, 88 anni (Tab. A), sottoposto ad intervento chirurgico per rimozione di carcinoma renale molti anni prima, si presentava con recidiva di malattia e metastasi polmonari e ossee (Tab. B). L'emocromo pre-terapia mostrava una marcata linfocitopenia. La caratterizzazione immunofenotipica delle sottopopolazioni linfocitarie evidenziava una netta riduzione dei linfociti T nei valori percentuali e assoluti, con relativo incremento di cellule NK; linfociti B percentualmente nella norma, ridotti in valore assoluto. Si sottolineava una marcata riduzione del rapporto  $CD4^+/CD8^+$  con evidenza di bassissimi valori di linfociti helper (Tab. C e D). Post terapia (Tab. E) il quadro citometrico dimostrava un ulteriore riduzione dei linfociti con assetto delle sottopopolazioni T, B, NK pressoché invariato (Tab. C e D). Il paziente è deceduto per progressione di malattia dopo la prima infusione di farmaco (Tab. E).
- Il paziente ACV, età 79 anni (Tab. A), si presentava alla diagnosi con metastasi ossee (Tab. B). All'esame emocromocitometrico pre-terapia mostrava valori assoluti di linfociti nella norma. Lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie evidenziava un aumento del valore assoluto delle cellule NK e una marcata diminuzione dei linfociti B (Tab. C e D). Dopo tre mesi dalla terapia (Tab. E) i valori assoluti dei NK sono rientrati

nella normalità mentre i linfociti B sono aumentati (Tab. C e D). A livello clinico il paziente presenta della riduzione alle lesioni ossee; ciò nonostante si osserva una parziale remissione di malattia (Tab. E).

- Il paziente SA, età 65 anni (Tab. A), si proponeva alla diagnosi con metastasi epatiche, polmonari e peritoneali (Tab. B). L'analisi del sangue presentava valori assoluti di linfociti nella norma. La caratterizzazione immunofenotipica delle sottopopolazioni linfocitarie mostrava una diminuzione significativa dei CD4<sup>+</sup> nei valori assoluti ed inoltre una netta diminuzione dei CD19<sup>+</sup> nei valori percentuali e assoluti. Si osservava una diminuzione del rapporto linfociti helper/citotossici (Tab. C e D). A tre mesi dalla prima infusione (Tab. E), l'analisi rivelava un lieve calo nei valori percentuali di linfociti helper e un aumento nei valori assoluti. Linfociti B in diminuzione oltre alla riduzione del rapporto CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Tab. C e D). Clinicamente il paziente manifesta una remissione parziale di malattia (Tab. E).
- Il paziente GE, età 78 anni (Tab. A), mostrava metastasi ossee e polmonari (Tab. B). All'emocromo il paziente manifestava una marcata linfopenia e allo studio citofluorimetrico delle sottopopolazioni linfocitarie si osservava una prevalenza percentuale di elementi T, con rapporto CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> nella norma, ma chiaramente con valori assoluti di

tutte le sottopopolazioni al di sotto del range di normalità (Tab. C e D). Dopo tre mesi dalla terapia (Tab. E), permaneva una situazione stabile per le sottopopolazioni linfocitarie, eccetto un ulteriore severo calo dei linfociti B (Tab. C e D). A livello clinico, il paziente ha ottenuto una parziale remissione di malattia (Tab. E).

- Il paziente LG, 78 anni (Tab. A), presentava metastasi sottocutanee (Tab. B). All'emocromo pre-terapia rivelava valori assoluti di linfociti nella norma. La tipizzazione linfocitaria evidenziava una diminuzione nei valori percentuali e assoluti di linfociti T, un aumento nei valori percentuali e assoluti di NK e diminuzione dei linfociti B (Tab. C e D). Post terapia (Tab. E) il quadro citometrico è rimasto invariato (Tab. C e D). Il paziente è in miglioramento clinico (Tab. E).

Alla luce dei risultati ottenuti, sopra descritti, si evince un assetto immunologico di base (al T<sub>+0</sub>) diversificato nei vari pazienti, che tende tuttavia a rimanere pressoché invariato dopo tre mesi dalla prima infusione di terapia. I cambiamenti principali si manifestano a carico della conta assoluta dei linfociti B. In linea generale, nei pazienti con risposta parziale o completa emerge un più basso livello di linfociti B rispetto ai pazienti non-responder. Questo dato ci fa ipotizzare un possibile ruolo di queste cellule nella modulazione della risposta alla terapia. Il calo dei linfociti B circolanti potrebbe riflettere al

contrario una maggiore concentrazione degli stessi nel microambiente tumorale infiammatorio (I-TME). Alcuni studi hanno dimostrato che un aumentato infiltrato di linfociti T CD8<sup>+</sup>, di cellule NK e appunto di linfociti B si è dimostrato un fattore prognostico positivo e un potenziale fattore predittivo di risposta all'immunoterapia (Li J et al,2018; Cabrita R et al, 2020). Il I-TME è costituito da una popolazione eterogenea di cellule immunitarie come linfociti T e B, monociti\macrofagi, granulociti neutrofili, cellule NK e fibroblasti (Li J et al, 2018). La maggior parte degli studi sull'efficacia dei farmaci che agiscono sugli immuno-checkpoints, tipo pembrolizumab, hanno focalizzato l'attenzione sul comparto linfocitario T, ma è ipotizzabile un ruolo anche degli altri subsets linfocitari nella risposta immunitaria contro le cellule tumorali (Fridman WH et al, 2017; Tsou P et al 2016). I risultati da noi ottenuti puntano la nostra attenzione in particolare sui linfociti B. Il ruolo ed i pathways attraverso cui agiscono i linfociti B nel promuovere un miglior outcome in vari tipi di cancro non sono del tutto chiariti e necessitano di approfondimenti, tuttavia evidenze hanno dimostrato una correlazione positiva tra la densità di questi elementi nel I-TME e la miglior risposta alla terapia (Colbeck EJ et al, 2017; Dieu-Nosjean Mc et al, 2014; Sautès-Fridman C et al, 2019; Ladanyi A et al,2007; Messina JL et al, 2012).Verosimilmente, la netta riduzione dei linfociti B nel circolo periferico da noi osservata nei pazienti che hanno risposto

meglio alla terapia immunomodulante, potrebbe indicare una sorta di “sequestro” di queste cellule nel microambiente tumorale, dove andranno ad interagire con gli altri subsets linfocitari. Infatti, i linfociti B, oltre a produrre anticorpi, sono anche in grado di produrre citochine e di interagire con gli altri attori della risposta immunitaria (Claudia Mauri et al, 2012). Alcuni autori, attraverso studi sia su modelli animali che umani, hanno recentemente dimostrato che proprio i linfociti B potrebbero svolgere un ruolo di rilievo nella risposta all’immunoterapia, nel sarcoma dei tessuti molli (Petitprez F et al, 2020), nel melanoma metastatico (Cabrita R et al, 2020; Helmink BA et al, 2020) e appunto nel carcinoma renale (Helmink BA et al, 2020).

## CONCLUSIONI

Lo scenario terapeutico del carcinoma renale metastatico si è rivoluzionato negli ultimi anni con l'approvazione di nuove opzioni terapeutiche, tra cui gli immune-checkpoints inhibitors e la loro associazione con il target therapy (Gulati S et al, 2020; Rebuzzi SE et al, 2019). Tuttavia, non tutti i pazienti in terapia rispondono al trattamento o mantengono un beneficio duraturo nel tempo (Rebuzzi SE et al, 2019). L'identificazione di biomarcatori prognostici e predittivi in grado di identificare pazienti che potrebbero beneficiare dell'immunoterapia è una necessità clinica, al centro delle attuali ricerche. Il nostro lavoro ha focalizzato l'attenzione sull'assetto immunologico di pazienti affetti da carcinoma renale metastatico, pre- e post-infusione di immunoterapico, evidenziando in particolar modo una correlazione tra bassi livelli di linfociti B circolanti e una migliore risposta clinica. Il database è in continuo aggiornamento ed ampliamento. I dati ottenuti andranno confermati su un più ampio numero di pazienti, anche per conferire allo studio una maggiore significatività statistica. Inoltre, una possibile prospettiva futura potrebbe essere la correlazione dei risultati da noi ottenuti mediante lo studio citofluorimetrico del sangue periferico, con l'analisi del microambiente tumorale infiammatorio in immunoistochimica. La raccolta e la successiva analisi di questi dati consentirebbero di valutare in maniera più approfondita il

ruolo prognostico e predittivo del I-TME in correlazione proprio con l'assetto immunologico delle sottopopolazioni linfocitarie circolanti. Inoltre, un obiettivo futuro potrebbe essere quello di trovare un valore cut-off di linfociti B, pre- e post-infusione del farmaco, da inserire eventualmente nei protocolli clinici, per la valutazione della prognosi e della predittività sull'efficacia della terapia. Mediante la conta delle sottopopolazioni linfocitarie del sangue periferico in citometria a flusso, metodica altamente sensibile e specifica, gli oncologi clinici potrebbero avere a disposizione, in tempi molto rapidi per ciascun paziente, informazioni con un elevato impatto sulla gestione clinico-terapeutica dei soggetti affetti da carcinoma renale avanzato.



## BIBLIOGRAFIA

Algaba F, Akaza H, López-Beltrán A, Martignoni G, Moch H, Montironi R, Reuter V: Current pathology keys of renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2011; 60:634-43.

Aranburu A, Ceccarelli S, Giorda E, Lasorella R, Ballatore G and Carsetti R: TLR ligation triggers somatic hypermutation in transitional B cells inducing the generation of IgM memory B cells. *J Immunol* 2010; 185:7293-301.

Atkins M B, Plimack E R, Puzanov I, Fishman M N, McDermott D F, Cho D C, Vaishampayan U, George S, Olencki T E, Tarazi J C, Rosbrook B, Fernandez K C, Lechuga M, Choueiri T K: Axitinib in combination with pembrolizumab in patients with advanced renal cell cancer: a non-randomised, open-label, dose-finding, and dose-expansion phase 1b trial. *Lancet Oncol* 19 2018; pp 405-415.

Cabrita R, Lauss M, Sanna A, Donia M, Larsen M S, Mitra S, Johansson I, Phung B, Harbst K, Vallon-Christersson J, van Schoiack A, Lövgren K, Warren S, Jirström K, Olsson H, Pietras K, Ingvar C, Isaksson K, Schadendorf D, Schmidt H, Bastholt L, Carneiro A., Wargo J A, Svane I M & Jönsson G: Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature* 2020;577:561–565.

Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado M M, Plebani A, Auriti C, Seganti G, Zuntini R, Ferrari S, Cagliuso M, Quinti I, Carsetti R: CpG derives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *Immunol.* 2008; 180:800-8.

Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler G M, Bos N A, Johnsen H E, Orfao A, Perez-Andres M: Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica* 2010; 95:1016-20.

Chantepie S P, Cornet E, Salaün V, Reman O Hematogones: An overview. *Leuk Res.* 2013; 37:1404-11.

Choueiri T K, Powles T, Burotto M, Escudier B, Bourlon M T, Zurawski B, Oyervides Juárez V M, Hsieh J J, Basso U, Shah A Y, Suárez C, Hamzaj A, Goh J C, Barrios C, Richardet M, Porta C, Kowalyszyn R, Feregino J P, Żołnierek J, Pook D, Kessler E R, Tomita Y, Mizuno R, Bedke J, Zhang J, Maurer M A, Simsek B, Ejzykowicz F, Schwab G M, Apolo A B, and Motzer R J: Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 384 2021; pp 829-841.

Cohen HT, McGovern FJ: Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2005;353 :2477-90.

Colbeck, E. J., Ager, A., Gallimore, A. & Jones, G. W: Tertiary lymphoid structures in cancer: drivers of antitumor immunity, immunosuppression, or bystander sentinels in disease? *Front. Immunol.* 8, 1830;2017.

Colombo R, Olmo E, *BIOLOGIA Cellula e Tessuti* 2<sup>a</sup> edizione. Copyright 2014 Edi.Ermes s.r.l.,Milano.

Dieu-Nosjean M. C., Goc J., Giraldo N. A., Sautès-Fridman C. & Fridman W. H: Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol.* 35, 571–580; 2014.

Estfan B, Byrne M, Kim R. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma: hypertension as a potential surrogate marker for efficacy. *Am J Clin Oncol.* 2013;36:319-24.

Fridman W. H., Zitvogel L., Sautès-Fridman C. & Kroemer G: The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, 717–734; 2017.

Gulati S, Vaishampayan U: Current State of Systemic Therapies for Advanced Renal Cell Carcinoma. *Curr Oncol Rep.* 2020;22:26.

Hamnvik OP, Choueiri TK, Turchin A, McKay RR, Goyal L, Davis M, Kaymakcalan MD, Williams JS. Clinical risk factors for the development of

hypertension in patients treated with inhibitors of the VEGF signaling pathway. *Cancer*. 2015;121:311-9.

Harwood FC, Klein Geltink RI, O'Hara BP, Cardone M, Janke L, Finkelstein D, Entin I, Paul L, Houghton PJ, Grosveld GC ETV7 is an essential component of a rapamycin-insensitive mTOR complex in cancer.. *Sci Adv* 2018; 4:eaar3938.

Helmink BA, Reddy SM, Gao J, Zhang S, Basar R, Thakur R, et al. B Cells and Tertiary Lymphoid Structures Promote Immunotherapy Response. *Nature* 2020; 577:549–55.

Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, Heng DY, Larkin J, Ficarra V: Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17009.

Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüegg MA, Hall A, Hall MN: Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*. 2004; 6:1122-8.

Jiao Q, Bi L, Ren Y, Song S, Wang Q, Wang YS: Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol Cancer*. 2018;17:36.

Karami S, Brennan P, Navratilova M, Mates D, Zaridze D, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Matveev V, Szesznia-Dabrowska N, Holcatova I, Yeager M, Chanock S, Rothman N, Boffetta P, Chow WH: Moore LE. Vitamin d pathway genes, diet, and risk of renal cell carcinoma. *Int J Endocrinol.* 2010;2010:879362.

Klein U, Rajewsky K, R Küppers Human: Immunoglobulin (Ig)M<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998; 188:1679-89.

Klümper HJ, Samer CF, Mathijssen RH, Schellens JH, Gurney H: Moving towards dose individualization of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev.* 2011;37:251-60.

Kolibaba KS, Druker BJ: Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1333:F217-48.

Ladányi A, Kiss J, Somlai B, Gilde K, Fejos Z, Mohos A, Gaudi I, Tímár J: Density of DC-LAMP<sup>+</sup> mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 1459–1469;2007.

Lam JS, Leppert JT, Beldegrun As and Figlin RA: Novel approaches in the therapy of metastatic renal cell carcinoma. *World J Urol* 23 2005, pp.202-2012.

Li J, Byrne KT, Yan F, Yamazoe T, Chen Z, Baslan T, Richman L P, Lin J H, Sun Y H, Rech A J, Balli D, Hay C A, Sela Y, Merrell A J, Liudahl S M, Gordon N , Norgard R J, Yuan S, Yu S, Chao T , Ye S , Eisinger-Mathason T S K , Faryabi R B, Tobias J W, Lowe S W, Coussens L M , Wherry E J, Vonderheide R H, Stange B Z: Tumor Cell-Intrinsic Factors Underlie Heterogeneity of Immune Cell Infiltration and Response to Immunotherapy. *Immunity*.2018;49:178-93 e7.

Ljunggren H-G, Kärre K: In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 11 1990; pp. 237-240.

Luciani LG, Cestari R, Tallarigo C: Incidental renal cell carcinoma-age and stage characterization and clinical implications: study of 1092 patients (1982-1997). *Urology*. 2000 ;56:58-62.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S: The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002;298:1912-34.

McKenzie J L, Gan O I, Doedens M, Wang J C Y, Dick E J: Individual stem cells with highly variable proliferation and self-renewal properties compromise

the human hematopoietic stem cell compartment. *Nature Immunol.* 2006; 7:1225-1233.

Messina J L, Fenstermacher D A, Eschrich S, Qu X, Berglund A E, Lloyd M C, Schell M J, Sondak V K, Weber J S, Mulé J J: 12 -Chemokine gene signature identifies lymph node-like structures in melanoma: potential for patient selection for immunotherapy? *Sci. Rep.* 2, 765; 2012.

Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM: The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol.* 2016;70:93-105.

Norman RA, Toader D, Ferguson AD: Structural approaches to obtain kinase selectivity. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33:273-8.

Perez-Andres M, Paiva B, Nieto W G, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, Vogt Jr R F, Marti G E, Rawstron A C, Van Zelm M C, Van Dongen J J M, Johnsen H E, Klein B, Orfao A: Human peripheral blood B-cell compartments: A cross road in B-cell traffic. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2010; 78B:S47-S60.

Petitprez F, de Reyniès A, Keung EZ, Chen TW-W, Sun C-M, Calderaro J, et al: B Cells are Associated With Survival and Immunotherapy Response in Sarcoma. *Nature* 2020; 577:556–60.

Petrelli F, Borgonovo K, Cabiddu M, Lonati V, Barni S: Relationship between skin rash and outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with anti-EGFR tyrosine kinase inhibitors: a literature-based meta-analysis of 24 trials. *Lung Cancer*. 2012;78:8-15.

Rebuzzi S E, Perrone F, Bersanelli M, Bregni G, Milella M, Buti S: Prognostic and predictive molecular biomarkers in metastatic renal cell carcinoma patients treated with immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019; 24:1-17.

Rini BI, Bellmunt J, Clancy J, Wang K, Niethammer AG, Hariharan S, Escudier B: Randomized phase III trial of temsirolimus and bevacizumab versus interferon alfa and bevacizumab in metastatic renal cell carcinoma: INTORACT trial. *J Clin Oncol*. 2014; 10;32:752-9.

Rispaal D, Eltschinger S, Stahl M, Vaga S, Bodenmiller B, Abraham Y, Filipuzzi I, Movva NR, Aebbersold R, Helliwell SB, Loewith R J: Target of Rapamycin Complex 2 Regulates Actin Polarization and Endocytosis via Multiple Pathways *Biol Chem*. 2015; 290:14963-78.

Mosmann TR, Coffman RL: T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989;7:145.



Motzer R J, Tannir N M, McDermott D F, Frontera O A, Melichar B, Choueiri T K, Plimack E R, Barthélémy P, Porta C, George S, Powles T, Donskov F, Neiman V, Kollmannsberger C K, Salman P, Gurney H, Hawkins R, Ravaud A, Grimm M O, Bracarda S, Barrios C H, Tomita Y, Castellano D, Rini B I, Chen A C, Mekan S, McHenry M B, Wind-Rotolo M, Doan J, Sharma P, Hammers H J, Escudier B: Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-cell Carcinoma. *New Engl J Med* 378 2018; pp 1277-1290.

Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD: Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras Downward J *Nature*. 1994; 370:527-32.

Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J. & Fridman, W. H: Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 19, 307–325;2019.

Saxton RA: mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease *Sabatini DM Cell*. 2017; 168:960-976.

Scandling JD: Acquired cystic kidney disease and renal cell cancer after transplantation: time to rethink screening? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2:621-2.

Schwarz A, Vatandaslar S, Merkel S, Haller H: Renal cell carcinoma in transplant recipients with acquired cystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007;2:750-6.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A: Cancer statistics, *CA Cancer J Clin* 2020.

Skinner DG, Colvin RB, Vermillion CD, Pfister RC, Leadbetter WF: Diagnosis and management of renal cell carcinoma. A clinical and pathologic study of 309 cases. *Cancer.* 1971;28:1165-77.

Swami U, Nussenzeig RH, Haaland B, Agarwal N: Revisiting AJCC TNM staging for renal cell carcinoma: quest for improvement. *Ann Transl Med.* 2019;7(Suppl 1)S18.

Terada T, Noda S, Inui K: Management of dose variability and side effects for individualized cancer pharmacotherapy with tyrosine kinase inhibitors. *Pharmacol Ther.* 2015;152:125-34.

Tong M, Seeliger MA: Targeting conformational plasticity of protein kinases. *ACS Chem Biol* 2015; 16;10:190-200.

Trinchieri G: Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989; 47:187.

Tsou, P., Katayama, H., Ostrin, E. J. & Hanash, S. M: The emerging role of B cells in tumor immunity. *Cancer Res.* 76, 5597–5601;2016.

Tura S: Corso di malattie del sangue e degli organi emolinfopoietici. Società Editrice Esculapio. 2015; 1-15.

Valtriani C, Hurle C, Balagi S, Manzin A: Citofluorimetria a flusso: aspetti generali con riferimento particolare allo studio di alcune malattie ematologiche. *Caleidoscopio italiano*. 1997; 113.

Wu P, Nielsen TE, Clausen MH: FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36:422-39.

Xu J, Pham CG, Albanese SK, Dong Y, Oyama T, Lee CH, Rodrik-Outmezguine V, Yao Z, Han S, Chen D, Parton DL, Chodera JD, Rosen N, Cheng EH, Hsieh JJ: Mechanistically distinct cancer-associated mTOR activation clusters predict sensitivity to rapamycin *J Clin Invest*. 2016; 126:3526-40.

Yin Y, Hua H, Li M, Liu S, Kong Q, Shao T, Wang J, Luo Y, Wang Q, Luo T, Jiang Y: mTORC2 promotes type I insulin-like growth factor receptor and insulin receptor activation through the tyrosine kinase activity of mTOR *Cell Res*. 2016; 26:46-65.

Zamai L: Dispensa di citometria applicata. Università di Urbino. 2014;110-146.

## SITOGRAFIA

[www.slideplayer.it](http://www.slideplayer.it) – Pag. 3, 39

[www.treccani.it](http://www.treccani.it) – Pag. 7, 11

[www.scienze.uniroma2.it](http://www.scienze.uniroma2.it) – Pag. 10

[www.infermieristica.polodidattico.com](http://www.infermieristica.polodidattico.com) – Pag. 15

[www.docenti.unina.it](http://www.docenti.unina.it) – Pag. 18

[www.chimicaonline.it](http://www.chimicaonline.it) – Pag. 20

[www.nationalcancerinstitute.com](http://www.nationalcancerinstitute.com) – Pag. 24

[www.dpcf.unisi.it](http://www.dpcf.unisi.it) – Pag. 26

[www.medecinapertutti.it](http://www.medecinapertutti.it) – Pag. 27

[www.semanticscholar.org](http://www.semanticscholar.org) – Pag. 31

[www.nature.com](http://www.nature.com) – Pag. 33

[www.biologa.altervista.org](http://www.biologa.altervista.org) – Pag. 38

[www.differbetween.com](http://www.differbetween.com) – Pag. 44

[www.3tre3.it](http://www.3tre3.it) – Pag. 46

## RINGRAZIAMENTI

Eccomi qui, giunta alla fine di un percorso fatto di lacrime e salite. Vorrei dedicare quest'ultima pagina a chi ha creduto e tutt'ora crede in me, aiutandomi a non perdere mai la speranza. Innanzitutto desidero ringraziare il relatore di questa tesi, la Prof.ssa Elisabetta Damiani, per la disponibilità, l'attenzione e la gentilezza dimostrate durante la stesura del mio lavoro. Un sentito ringraziamento alla Dott.ssa Clelia Perfetti e tutto il personale sanitario del laboratorio clinico dell'ospedale di Civitanova Marche che mi hanno accolta a braccia aperte, regalandomi mille risate e preziosi consigli. In particolare, i miei più sinceri e profondi ringraziamenti vanno al correlatore Dott. Davide Vagnoni per la professionalità e la tantissima pazienza con cui mi ha seguito nell'elaborazione della tesi, permettendomi così di vivere un'esperienza unica e di mettermi in gioco scoprendo la realtà lavorativa. Tutto il mio amore e la mia dedizione vanno alla mia famiglia. Ai miei genitori, le mie colonne portanti, che mi hanno permesso di coltivare gli studi, che hanno creduto nelle mie capacità ed appoggiato i miei progetti di vita. A mio fratello Samuele e mia sorella Sofia a cui voglio un bene dell'anima. Sono il regalo più bello che la vita mi potesse dare. A Samuele, che mi ha rinforzata con la sua discreta e silenziosa presenza e a Sofia, la mia piccola Sofì, a cui devo i suoi baci, i suoi abbracci e sorrisi nei momenti più tristi. Alle mie nonne, Giovanna e

Giuseppina che con le loro frasi di incoraggiamento “Nonna, fatti il Segno della Croce e va avanti”, “Prego tanto per te, nonna”, non mi hanno fatto mai sentire sola. A loro devo l’energia, l’audacia e la saggezza. Ad Eleonora per tutta l’amicizia e l’affetto che mi ha donato incondizionatamente e a Stefania, preziosa compagna di avventure e disavventure, senza la quale tutto sarebbe stato più difficile e sicuramente anche meno divertente. Alle amiche d’infanzia, il mio punto di riferimento da cui parto e a cui torno in ogni circostanza, Marta e Beatrice, che mi hanno sempre sostenuta sia nei momenti di difficoltà sia in quelli di felicità e spensieratezza. Ed infine a Giovanni, la mia persona, che mi è stato costantemente vicino, ha asciugato in segreto le mie lacrime, ha incoraggiato i miei passi e subito i miei sbalzi di umore. Mi ha insegnato che, ad ogni difficoltà, grande o piccola che sia, ci si deve sempre rialzare senza mai arrendersi e per questo non smetterò mai di ringraziarlo.