INDICE:

1. Carcinomi della mammella……...……..…3

1.1 Epidemiologia……..……..……..…3

1.2 Fattori di rischio e prevenzione…….……..…..…..……4

1.3 Inquadramento anatomo-patologico…….....…6

1.4 Classificazione e grading del carcinoma mammario……....15

2. Terapia del carcinoma mammario…….....……..24

2.1 Trattamento chirurgico……..……....……..24

2.2 Trattamento adiuvante……..……..……..27

2.3 *Terapia sistemica neoadiuvante……..……..……..……32*

3. TIL (Tumor-infiltrating lymphocytes)……..……39

3.1 Generalità e validità clinica……..……39

3.2 L'immunoterapia nella pratica clinica……..……..41

3.3 L'immunoterpia nel carcinoma mammario……..……46

3.4 Raccomandazioni metodologiche per la valutazione dei TIL nel carcinoma mammario……48

3.5 Approccio operativo……49

3.6 Infiltrato linfocitario tumorale nella malattia residua post NACT……53

4. Parte sperimentale……60

4.1 Introduzione……60

4.2 *Materiali e metodi……61*

5. Risultati……72

6. Conclusioni……91

7. Bibliografia……93

8. Ringraziamenti……95

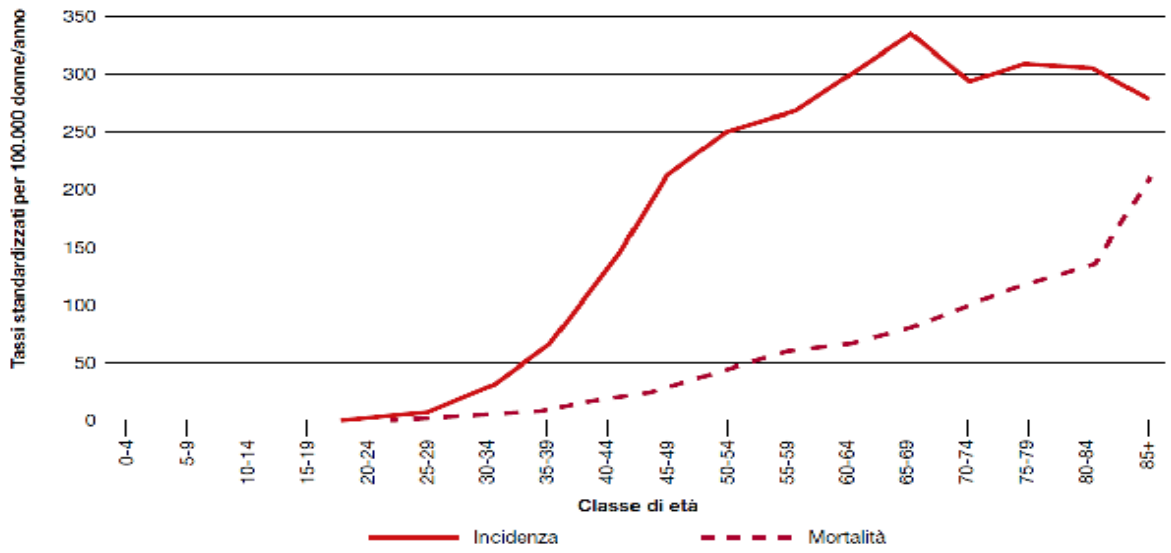
Capitolo 1

CARCINOMI DELLA MAMMELLA

1.1 Epidemiologia

Il carcinoma mammario è la neoplasia più diagnosticata e la causa principale di morte correlata a cancro nelle donne; rappresenta la prima neoplasia per frequenza nelle donne al di sotto dei 45 anni, con una incidenza ancora più elevata nelle donne fino a 65 anni. Rappresenta il 22% di tutti i tumori, il 29% di tutti i tumori femminili, comportando una mortalità del 16%; significativo è il dato relativo alla sopravvivenza a 5 anni, ad oggi riguardante il 90% circa delle pazienti, che dimostra come la mortalità per tumore al seno sia in costante diminuzione nell'ultimo decennio, grazie anche alla prevenzione e al corretto iter diagnostico-terapeutico. In Europa, ogni anno più di 200.000 donne vengono colpite da tumore al seno, con un'incidenza variabile dal 5 al 10% a seconda dei Paesi. In Italia l'incidenza è medio-alta, i casi di cancro al seno diagnosticati sono di circa 31.000 all'anno, i tassi di incidenza standardizzati per età sono del 30-35% più elevati al Nord che nel Sud. Le differenze geografiche si stanno però riducendo e sono praticamente confinate

all'età superiore a 50 anni, nelle giovani donne l'incidenza è invece uniforme. Nel sesso maschile è più raro, solo l'1% delle neoplasie maligne.



1.2 Fattori di rischio e prevenzione

Sono stati associati alla malattia diversi fattori di rischio, i più rilevanti sono:

- Età: la maggior parte dei tumori al seno si verifica nelle donne > 50 anni.
- Familiarità e genetica: negli ultimi anni, sono stati identificati diversi geni responsabili della trasmissione ereditaria del

carcinoma mammario, BRCA1, BRCA2, P53, PTEN, ATM. Una loro mutazione, è responsabile della maggior parte dei tumori ereditari. BRCA1, BRCA2 (geni a trasmissione autosomica dominante) comportano un rischio del 60- 90% di sviluppare nel corso della vita un carcinoma mammario.

- Anamnesi ginecologica: menarca precoce, menopausa tardiva e prima gravidanza tardiva aumentano il rischio. La maternità, invece, sembra avere un ruolo protettivo: le donne che hanno partorito presentano un rischio inferiore del 25% rispetto a quelle che non hanno avuto figli, ed il rischio è tanto minore quanto più precocemente è avvenuto il primo parto.

- Terapie ormonali: incremento del rischio nelle donne che assumono terapia ormonale sostitutiva e contraccettivi orali.

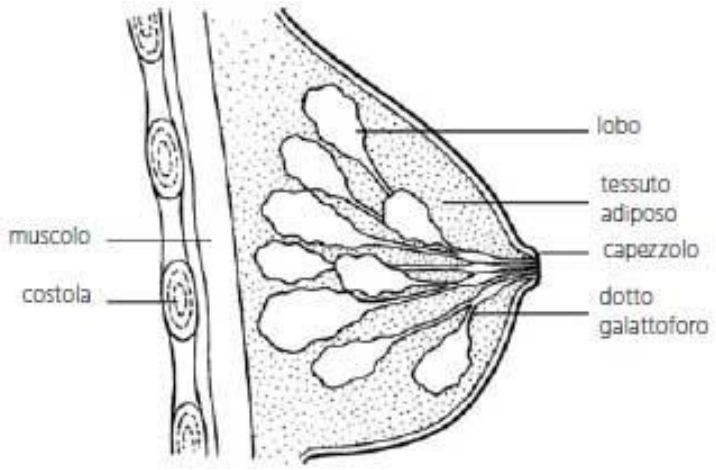
- Stile di vita: una dieta ricca di vegetali, frutta e fibre ed una regolare attività fisica, sembrano diminuiscano il rischio di tumore mammario. Il consumo di alcol, una dieta ricca di grassi saturi e proteine animali, l'abitudine al fumo e vita sedentaria aumentano tale rischio.

La prevenzione del tumore al seno è da tradurre in realtà in diagnosi precoce; lo screening è un'attività di prevenzione secondaria periodica rivolta a donne asintomatiche al fine di effettuare una diagnosi di carcinoma mammario in stadio precoce, e con l'obiettivo principale di ridurre la mortalità. I programmi nazionali prevedono l'offerta gratuita della mammografia a donne tra i 50 e i 69 anni, con cadenza biennale. In generale però è consigliabile pianificare un programma di controlli anche prima dei 50 anni. In particolare nelle donne a rischio aumentato su base eredo-familiare o perché portatrici di mutazione di BRCA1 e/o BRCA2 i controlli strumentali dovrebbero essere iniziati all'età di 25 anni o 10 anni prima dell'età di insorgenza del tumore nel familiare più giovane (Linee Guida AIOM 2018 Neoplasie della Mammella).

1.3 Inquadramento anatomo-patologico

La mammella è un rilievo cutaneo pari e simmetrico, disposto sulla superficie antero-superiore del torace, lateralmente alla linea mediana anteriore, compreso nella fascia superficiale. Il termine "mammella" si riferisce alla ghiandola mammaria, alla cute e ai tessuti connettivali che circondano e sostengono la ghiandola. La ghiandola mammaria costituisce l'organo caratteristico dei mammiferi, e per la femmina un carattere sessuale secondario. Lo sviluppo maggiore della mammella si verifica soprattutto

nell'età adulta, e durante la vita riproduttiva subisce cicli di sviluppo e regressione; in particolare lo sviluppo ghiandolare strutturale e funzionale può essere distinto in cinque fasi: embrionale, infantile, puberale, gravidica e di lattazione.



La forma e le dimensioni della mammella dipendono dal sesso, da fattori genetici e dietetici, dalle fasi funzionali e dall'età. Il tessuto ghiandolare è formato da un sistema secretorio e da un sistema duttale; il primo è costituito da elementi sacciformi, gli alveoli, che si aprono nei duttuli, che a loro volta si congiungono per formare dotti di più grandi dimensioni e, infine, danno luogo ai dotti galattofori, che attraversando il capezzolo terminano in 10-15 stretti orifizi (0.4-0,7 mm di diametro) posti sul suo apice (area cribrosa). Ogni dotto drena un lobo del tessuto ghiandolare, i lobi sono suddivisi in 20-

40 lobuli, ciascuno dei quali consiste di 10-100 alveoli; si tratta dunque di una ghiandola tubuloalveolare composta, con una secrezione di tipo apocrino.

La classificazione anatomo-patologica secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità - WHO 2012 distingue per il carcinomi mammario infiltrante:

1. Carcinoma infiltrante di tipo non specifico (NST), comunemente noto come carcinoma duttale di tipo non specifico, comprende il gruppo più ampio di carcinomi invasivi della mammella (70%-80%) e rappresenta una entità non facilmente definibile poiché comprende un gruppo eterogeneo di tumori che non presentano caratteristiche sufficienti per poterli classificare come tipi istologici specifici.
2. Istotipi speciali:
    - Carcinoma lobulare infiltrante
    - Carcinoma tubulare
    - Carcinoma cribriforme
    - Carcinoma mucinoso
    - Carcinoma con caratteristiche midollari
    - Carcinoma con differenziazione apocrina
    - Carcinoma infiltrante micropapillare

- Carcinoma apocrino
- Carcinoma metaplastico

Precursori:

- Carcinoma duttale in situ (neoplasia duttale intraepiteliale)
  - Di basso grado nucleare (DIN1c/CDIS-G1)
  - Di grado nucleare intermedio (DIN2/CDIS-G2)
  - Di alto grado nucleare (DIN3/CDIS-G3).
- Carcinoma lobulare in situ (neoplasia lobulare intraepiteliale)
  - Carcinoma lobulare in situ classico (LIN2)
  - Carcinoma lobulare in situ pleomorfo (LIN3)
- Iperplasia lobulare atipica

Lesioni proliferative intraduttali:

Comprendono un gruppo di proliferazioni, differenti da un punto di vista citologico e architetturale, che orginano dall'unità terminale duttulo-lobulare e sono associate ad un aumentato rischio, sebbene di diversa entità, per lo sviluppo di un successivo carcinoma infiltrante:

- Iperplasia duttale usuale (UDH)

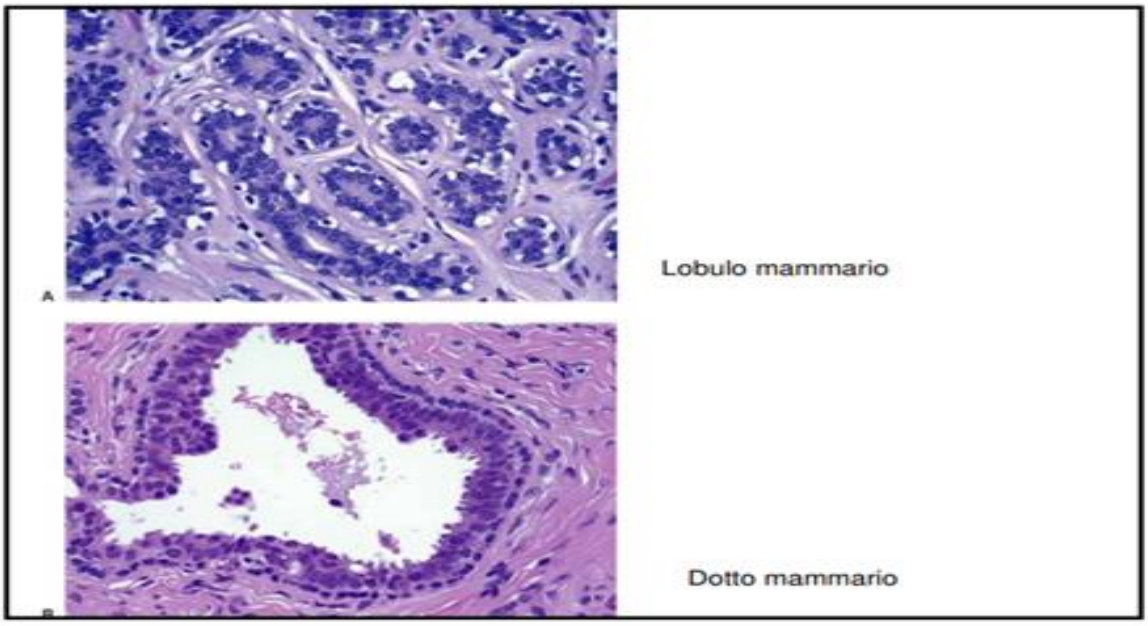
- Lesioni a cellule colonnari (CCC, CCH) comprendenti l'atipia epiteliale piatta (FEA/DIN1a)
- Iperplasia duttale atipica (DIN1b/ADH)
- Iperplasia lobulare atipica (LIN1).

Il *carcinoma mammario* indica una lesione epiteliale maligna che origina dalle cellule epiteliali dell'albero ghiandolare e può dar luogo a diversi istotipi. Di questi i più frequenti sono il carcinoma duttale e lobulare che si sviluppano dalle cellule che rivestono rispettivamente i dotti o i lobuli; in realtà la maggior parte dei carcinomi insorge nelle unità terminali dotto-lobulari (UTDL) e successivamente si caratterizza e differenzia per morfologia e comportamento biologico.

Entrambi i tipi si possono presentare nella forma non invasiva denominata in situ, (DCIS e LCIS, rispettivamente) riferendosi a una proliferazione di cellule tumorali senza invasione del tessuto stromale, o invasiva cioè infiltrante.

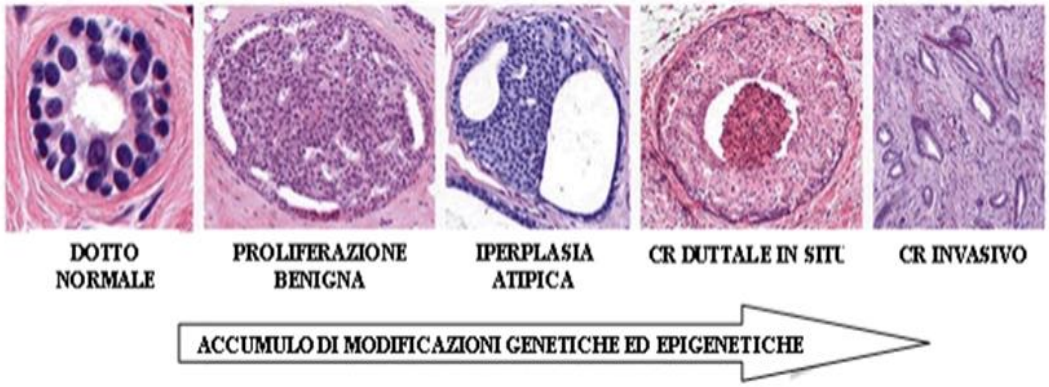
Il carcinoma duttale infiltrante rappresenta il 70-80% di tutte le forme di cancro al seno; il carcinoma lobulare infiltrante rappresenta il 10-15%.

Altri istotipi sono meno rappresentativi, carcinoma midollare (15%), mucinoso (2%), tubulare (1-2%), (ma con una prognosi migliore dei tipi duttale e lobulare) ai quali si aggiungono numerose altre forme rare.



Il passaggio dalle strutture normali al carcinoma in situ ha luogo mediante la formazione di lesioni intermedie, diverse per i due tipi principali di tumore, indicate come lesioni preneoplastiche. Analisi di genetica molecolare e citogenetica hanno infatti dimostrato come il carcinoma della mammella in modo simile ad altre neoplasie, derivi da un processo multistep caratterizzato

dall'accumulo di varie alterazioni genetiche. Pertanto tutti i carcinomi invasivi originano inizialmente da lesioni in situ che hanno subito alterazioni genetiche ed epigenetiche che influenzano la morfologia e le funzioni cellulari.



Progressione carcinoma mammario

L'iter che va dalle lesioni preneoplastiche alle metastasi, passando attraverso il carcinoma in situ e quello infiltrante, rappresenta l'aspetto morfologico della cosiddetta progressione tumorale. Le fasi della progressione che precedono il carcinoma duttale in situ sono rappresentate dall'iperplasia duttale florida e dall'iperplasia duttale atipica, dovute ad un'iperplasia a cui vanno incontro le cellule epiteliali delle UTDL. La forma florida consiste nella formazione di numerosi strati cellulari (oltre 34) con creazione di ponti che attraversano il lume e di aree solide che riempiono e distendono i dotti

stessi; nella forma atipica, a questi caratteri si aggiunge la presenza di atipie citologiche simili a quelle dei carcinomi in situ non comedonici, dai quali si differenziano per le dimensioni (ADH < 2 mm; CDIS > 2 mm). Il carcinoma lobulare in situ è preceduto dall'iperplasia lobulare atipica, dalla quale si differenzia essenzialmente per l'estensione (LIN1 <2 mm; LIN2 > 2 mm).

Il carcinoma duttale in situ (o intraduttale) può avere una morfologia diversa, per cui se ne distinguono due gruppi principali: comedonico e non comedonico. Quest'ultimo può avere aspetti solidi, cribrosi o cribriformi, o micropapillari. I tumori non comedo hanno cellule con nuclei piccoli, rotondi, monomorfi, con poche mitosi e in genere non hanno necrosi. Questa suddivisione è utile in quanto i comedocarcinomi hanno una maggiore malignità.

Le cellule del carcinoma lobulare in situ proliferano riempiendo i lumi delle UTDL; la presenza di questa lesione aumenta di 9 volte il rischio di un carcinoma invasivo nella stessa mammella o in quella controlaterale.

Il carcinoma infiltrante in assoluto più frequente è il duttale, caratterizzato da un'abbondante quantità di stroma fibroso o scleroialino, che gli conferisce una consistenza molto dura, da cui prende anche il nome di carcinoma scirroso (cioè duro); la popolazione neoplastica si dispone in isolotti solidi, in cordoni grossolani, in strutture tubulari. Spesso si usa aggiungere al termine

di carcinoma duttale infiltrante (o invasivo) le parole "non altrimenti specificato" (NAS, o NOS secondo la terminologia inglese), che distinguono questo istotipo dai cosiddetti istotipi speciali, più rari e a prognosi più favorevole quali il midollare ed il mucinoso. Il carcinoma lobulare infiltrante (o Invasivo) è caratterizzato dalla invasione da parte delle cellule dello stroma a formare filiere sottili, unicellulari (a 'fila indiana'), spesso disponendosi concentricamente intorno alle strutture duttali o lobulari. Questo tumore più spesso del precedente è multifocale e bilaterale.

Sia i carcinomi infiltranti sia quelli in situ possono contenere delle microcalcificazioni, piccole, numerose e riunite in gruppi, che sono di grande utilità per la diagnosi mammografica di neoplasia maligna.

I carcinomi invasivi della mammella si diffondono inizialmente per via linfatica, dando metastasi in primo luogo ai linfonodi ascellari e mammari interni, con frequenza diversa secondo la zona della mammella in cui sono insorti.

1.4 Classificazione e grading del carcinoma mammario:

Il ruolo prognostico dello stadio di malattia è noto, e il suo utilizzo nella pianificazione terapeutica del carcinoma della mammella ormai consolidato. Dallo studio dell'aspetto morfologico sono derivate le definizioni di:

• istotipo, e cioè carcinoma duttale, lobulare, mucinoso, papillare e tubulare, e la discriminazione tra forme invasive e non;

• grado istologico, distinto in grado 1,2,3 sulla base della formazione di strutture tubulari, numero di mitosi ed entità di atipie nucleari (grading sec. Elston-Ellis);

• dimensione del tumore: l'estensione della malattia è indicata in mm.

• grado nucleare, distinto in grado 1, 2, e 3, corrispondenti rispettivamente a un elevato, moderato e scarso differenziamento dei nuclei, definito sulla base della loro forma, atipia e colorabilità;

• invasione dei vasi linfatici, ossia la presenza di emboli neoplastici nei vasi linfatici peritumorali;

• neoangiogenesi tumorale: la capacità di produrre fattori angiogenetici, correlati alla malignità del tumore, si traduce in una maggiore possibilità d'invasione delle cellule neoplastiche nel circolo ematico, aumentando la possibilità di diffusione metastatica.

Il tumore della mammella è stato caratterizzato e classificato sulla base delle dimensioni (T), della diffusione linfonodale (N) e a distanza (M) al momento della diagnosi, e stadiato secondo il sistema TNM:

- misura dei diametri del tumore infiltrante e valutazione dei rapporti che contrae con le strutture vicine (codificate nella sigla **pT** da 1 a 4, maggiore è il numero più grande è il tumore);

- assenza, presenza e misurazione di eventuali metastasi linfonodali (situazione codificata con la sigla **pN** da 0 a 3 con sottoclassi specificate con lettere alfabetiche, maggiore è il numero più numerosi sono i linfonodi metastatici). I valori di pT e pN diagnosticati forniscono la base per la definizione dello stadio TNM (da 1 a 4 con progressivo peggioramento prognostico).

La stadiazione del tumore secondo il TNM è indispensabile per la valutazione terapeutica e prognostica.

T0	tumore (T) non rilevabile
Tis	carcinoma *in situ*, o preinvasivo
T1	T ≤ 2 cm (T1a ≤ 0,5 cm; T1b ≤ 1 cm; T1c ≤ 2 cm)
T2	2 cm < T ≤ 5 cm (T2a senza fissità alla fascia o al muscolo pettorale; T2b con fissità alla fascia o al muscolo pettorale)
T3	T > 5 cm (T3a senza fissità alla fascia o al muscolo pettorale; T3b con fissità alla fascia o al muscolo pettorale)
T4	tumore di qualunque dimensione, con estensione alla parete toracica (costole, muscoli intercostali, muscolo dentato anteriore) o alla cute (T4a estensione alla parete toracica; T4b estensione alla cute; T4c = T4a + T4b; T4d carcinoma infiammatorio)
TX	tumore primitivo non accertato
N0	assenza di metastasi linfonodali
N1	metastasi ai linfonodi ascellari omolaterali, che sono mobili
N2	metastasi ai linfonodi ascellari omolaterali, che sono fissati tra loro o ad altre strutture
N3	metastasi ai linfonodi mammari interni omolaterali o edema del braccio
NX	non vi sono i requisiti minimi per stabilire se ci sono metastasi linfonodali
M0	assenza di metastasi a distanza
M1	presenza di metastasi a distanza
MX	non vi sono i requisiti minimi per stabilire se ci sono metastasi a distanza

Dal punto di vista della sua evoluzione, il tumore viene classificato in 5 stadi:

- Stadio 0 è una condizione pre-cancerosa, rientrano in questa categoria i carcinomi lobulare e duttale, non invasivi
- Stadio I è la fase iniziale, sono classificati in questa categoria i carcinomi con un diametro inferiore ai 2 centimetri, circoscritte all'interno della mammella e che non abbiano ancora coinvolto i linfonodi.
- Stadio IIA, rappresenta carcinomi più grandi di 2 centimetri (fino a 5) che non abbiano ancora coinvolto i linfonodi ascellari;

- Stadio IIB il tumore misura tra i 2 e i 5 centimetri e si è già diffuso ai linfonodi, oppure è più grande di 5 centimetri ma non ha ancora raggiunto i linfonodi;
- Stadio IIIA è un tumore con dimensioni variabili che ha raggiunto i linfonodi ascellari o coinvolto altri tessuti vicini;
- Stadio IIIB il tumore viene definito localmente avanzato;
- Stadio IV è il cancro 'metastatico' che ha una prognosi meno favorevole.

stadio	T	N	M
stadio 0	Tis	N0	M0
stadio 1	T1	N0	M0
stadio 2A	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
stadio 2B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
stadio 3A	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1 o N2	M0
stadio 3B	T4	ogni N	M0
	ogni T	N3	M0
stadio 4	ogni T	ogni N	M1

Lo stato linfonodale è considerato uno dei fattori prognostici di particolare rilievo, le recidive compaiono nel 70% circa delle pazienti con metastasi linfonodali alla presentazione, contro il 20-30% circa delle pazienti senza metastasi linfonodali. Inoltre, nelle neoplasie di piccole dimensioni (inferiori a 2 cm di asse maggiore) la sopravvivenza a 5 anni diminuisce con l'aumentare del numero dei linfonodi metastatici. Il linfonodo sentinella è il primo linfonodo che riceve il drenaggio linfatico da una determinata neoplasia, pertanto lo stato del linfonodo sentinella riflette lo stato dei linfonodi regionali.

Il tumore al seno viene ancora classificato secondo la tipizzazione molecolare, a seconda della presenza di recettori ormonali sulla membrana cellulare; questi recettori rivestono un ruolo importante ai fini prognostici, in quanto la loro sovra-espressione (quantità) unita allo stadio, è indicativa della velocità di crescita del carcinoma, della probabilità di diffusione, nonché della risposta ad alcuni trattamenti. Alcuni messaggeri chimici, si legano ai recettori, inducendo variazioni nella cellula responsabili dell'effetto biologico. Le cellule cancerose possono esprimere o meno tre recettori importanti:

- il recettore dell'estrogeno (ER), e il recettore del progesterone (PR) come espressione di differenziamento, valutati con metodiche semiquantitative in immunoistochimica. Gli estrogeni in particolare, regolano la risposta cellulare

attraverso il legame con due specifici recettori intracellulari, ERα e ERβ (Estrogen Receptor α e β), fattori di trascrizione localizzati a livello citoplasmatico e nucleare. In seguito al legame dell'ormone, tali recettori subiscono un cambiamento conformazionale, dimerizzano e all'interno del nucleo legano le sequenze ERE (Estrogen Response Elements), modulando l'espressione di specifici geni target. Si tratta di un'importante informazione da acquisire, non solo come fattore prognostico, ma anche come importante indicatore di risposta al trattamento. La determinazione del recettore progestinico PgR, ulteriore proteina regolata dagli estrogeni, migliora la discriminazione tra neoplasie mammarie sensibili e non alla terapia ormonale; esistono evidenze di come nei carcinomi metastatici della mammella, la risposta al trattamento con farmaci anti-estrogenici sia migliore in pazienti che coesprimono ER e PgR, rispetto a quelli che esprimono solo ER.

- l'HER2/neu, è un gene localizzato sul cromosoma 17q12-21.32, che codifica per un mRNA di 4,6 Kb, tradotto in una proteina di 185 kDa, chiamata p185, la quale ha funzione recettoriale ad attività tirosin-chinasica. ErbB2 appartiene ad una famiglia di recettori per fattori di crescita che comprende ErbB1, meglio conosciuto come EGFR, ErbB3 (HER3) ed ErbB4 (HER4); ErbB2 non è in grado di legarsi a fattori endogeni, ma forma dimeri con altri recettori della famiglia, già legati, stabilizzandoli ed innescando la

trasduzione del segnale chinasi mediata. L'importanza del gene HER2/neu è emersa recentemente come indicatore di risposta all'immunoterapia; la sua sovraespressione, valutata all'immunoistochimica o tramite amplificazione genica (ISH), si correla all'elevato grado istologico, alle metastasi linfonodali, alla più giovane età e più in generale ad una prognosi peggiore rappresentando un consolidato fattore prognostico e un fattore predittivo di risposta ai farmaci anti-HER2.

In base alla presenza di tali recettori, i carcinomi vengono definiti:

-HR positivi (Hormone Receptors - positivi) se possiedono recettori per gli ormoni femminili, suddivisi ulteriormente in estrogeno-positivi (ER +) e progesterone-positivi (PR +);

-HER2 positivi (Human Epidermal Growth Factor Receptor2) se presentano recettori di tipo 2 del fattore di crescita epidermico umano;

-Triplo negativi se non presentano nessuno dei tre recettori.

Il carcinoma della mammella è una malattia eterogenea e pazienti con un quadro clinico-patologico simile possono presentare un decorso differente. Sono stati identificati infatti sottotipi immunofenotipici con implicazioni terapeutiche importanti:

- Luminali A: recettori ormonali positivi, HER2 negativo e bassa attività proliferativa, a prognosi favorevole;
- Luminali B HER2 negativi: recettori ormonali positivi, HER2 negativo ed alta attività proliferativa;
- Luminali B HER2 positivi: recettori ormonali positivi, HER2 sovraespresso;
- HER2 positivi (non luminali): HER2 sovraespresso ed entrambi i recettori ormonali negativi; la sua iper-espressione, che si verifica nel 20-30% dei casi, si associa generalmente a una prognosi peggiore. Per la terapia dei tumori HER-2 positivi oggi è possibile utilizzare il Trastuzumab, anticorpo monoclonale che si lega al recettore bloccando la trasduzione intracellulare del segnale.
- Triplo negativi: assenza di espressione dei recettori ormonali e negatività di HER2. Sono scarsamente differenziati, molto aggressivi, con una cattiva prognosi e con un'elevata probabilità di sviluppare metastasi a distanza; presentano alterazioni nell'espressione di proteine, oncogeni e oncosoppressori coinvolti in diversi pathways che regolano la proliferazione, la crescita cellulare e l'apoptosi. A causa della mancata espressione dei recettori ER, PR e HER-2, tali forme non sono

sensibili alle terapie ormonali o a quelle dirette e specifiche contro tali recettori.

Capitolo 2

TERAPIA DEL CARCINOMA MAMMARIO

I tipi di trattamento per il carcinoma della mammella possono essere sistemici o locali. Le terapie locali mirano ad asportare, distruggere o controllare le cellule neoplastiche di una determinata zona. Le terapie sistemiche distruggono e controllano le cellule tumorali diffuse in tutto l'organismo. L'intervento chirurgico rappresenta il trattamento più diffuso nel caso di tumore della mammella, negli anni però ha subito un importante evoluzione, oggi la chirurgia conservativa della mammella, nel trattamento dei tumori in stadio iniziale, ha progressivamente (ma non definitivamente) sostituito quella demolitiva, riuscendo a garantire le stesse percentuali di sopravvivenza con una migliore accettazione da parte delle pazienti.

2.1 Trattamento chirurgico

I programmi di screening e la maggiore sensibilizzazione della popolazione femminile al problema del carcinoma della mammella hanno portato negli ultimi anni ad un consistente aumento di carcinomi infiltranti della mammella in stadio precoce con un numero consistente di lesioni infiltranti non palpabili. Per tali neoplasie, nella maggior parte dei casi il trattamento chirurgico consiste in un intervento conservativo, in cui viene asportato del

tessuto mammario limitatamente al tumore, con un adeguato margine (Resezione parziale, Quadrantectomia). La tumorectomia per essere oncologicamente radicale deve estendersi fino alla fascia del muscolo pettorale che viene asportata insieme alla lesione. La quadrantectomia consiste in un'ampia resezione della neoplasia e del tessuto circostante, così da asportare un intero quadrante della mammella, con la porzione corrispondente della cute e della fascia pettorale. L'exeresi chirurgica deve essere sufficientemente ampia da asportare anche 2 centimetri di parenchima macroscopicamente sano intorno alla lesione neoplastica.

La Mastectomia rappresenta quel tipo di intervento chirurgico che vede l'asportazione in toto della mammella interessata dalla neoplasia; si rende necessaria nei casi in cui il tumore è voluminoso oppure è piccolo, ma con estesa componente intraduttale, oppure è multicentrico e multifocale. L'exeresi può essere limitata alle sole strutture mammarie quali la ghiandola, la cute che la riveste, l'areola ed il capezzolo oppure essere allargata ai sottostanti muscolo grande pettorale e muscolo piccolo pettorale.

Alla chirurgia si associa contemporaneamente la tecnica del "linfonodo sentinella". Poiché la diffusione metastatica ai linfonodi ascellari avviene in modo regolare e progressivo si procede all'asportazione selettiva con una piccola incisione solo il primo linfonodo di drenaggio regionale (linfonodo

“sentinella”), individuato intraoperatoriamente con una sonda radioguidata. La negatività istologica per metastasi di tale linfonodo (esaminato intraoperatoriamente) è altamente predittiva della negatività istologica di tutti gli altri linfonodi ascellari e consente quindi di evitare la dissezione ascellare completa, preservando la paziente dagli esiti invalidanti della linfoadenectomia ascellare (linfedema). Viceversa, la positività istologica del linfonodo sentinella è, invece, naturalmente indice di diffusione regionale della neoplasia e determina il ricorso alla dissezione completa dei linfonodi ascellari (linfoadenectomia ascellare). La dissezione linfonodale dell’ascella viene praticata, negli interventi conservativi, in continuità con la exeresi mammaria solamente quando il tumore è localizzato nei quadranti superiori esterni delle mammelle; in caso contrario la linfoadenectomia viene praticata con una incisione separata.

Dopo l’intervento di chirurgia conservativa, la mammella residua viene irradiata, al fine di ridurre il rischio di recidive tumorali locali, anche in considerazione della frequente multicentricità delle neoplasie mammarie.

Le ulteriori fasi della terapia di una neoplasia mammaria variano in rapporto al dato istopatologico-clinico di maggior rilievo per la prognosi della patologia oncologica della mammella: la presenza o l’assenza di metastasi linfonodali. Si è evidenziato che il 50% delle pazienti con tumore mammario

presenta nuovi segni di neoplasia, locali o a distanza, entro i primi tre anni dall'intervento se i linfonodi ascellari sono positivi e addirittura entro due anni se il loro numero è maggiore di 10. La presenza di metastasi linfonodali è perciò elemento indicativo di una neoplasia più aggressiva o comunque non più probabilmente localizzata e suggerisce quindi la necessità di aggiungere alla terapia locoregionale un ulteriore trattamento sistemico chemioterapico e/o ormonoterapico.

A seconda dei casi il trattamento sistemico può essere somministrato dopo quello chirurgico (terapia adiuvante) oppure prima rispetto a questo (terapia neoadiuvante).

2.2 Trattamento adiuvante

Il trattamento adiuvante consiste in una terapia sistemica che deve essere presa in considerazione dopo l'intervento chirurgico, in funzione della significativa riduzione del rischio di recidiva e di morte cui si correla. La terapia adiuvante si avvale sostanzialmente di tre diversi tipi di trattamento: la chemioterapia, la terapia endocrina, e la terapia con anticorpo monoclonale anti HER-2.

La scelta relativa alla terapia da utilizzare nella singola paziente richiede un'attenta valutazione di:

- Fattori prognostici, che definiscono l'entità del rischio di ripresa di malattia (Tabella 1);

- Fattori predittivi di risposta a specifici trattamenti (ER, HER2);

- Benefici attesi dal trattamento in termini di percentuale di beneficio assoluto ed effetti collaterali attesi;

- Comorbidità della paziente

Tabella1

FATTORI PROGNOSTICI ▪ DIAMETRO DEL TUMORE ▪ STATO E NUMERO DI LINFONODI METASTATICI ▪ ISTOLOGIA (NST; lobulare; mucinoso, tubulare, papillare; midollare, adenoido-cistico, apocrino) ▪ GRADO ISTOLOGICO ▪ ATTIVITA' PROLIFERATIVA (Ki67/MIB-1) ▪ STATO DEI RECETTORI ORMONALI E LIVELLO DI ESPRESSIONE DEI RECETTORI ORMONALI ▪ STATO DI HER2 ▪ Invasione vascolare ▪ ETA' DELLA PAZIENTE ▪ Profili di espressione genica
FATTORI PREDITTIVI ▪ STATO DEI RECETTORI ORMONALI E LIVELLO DI ESPRESSIONE DEI RECETTORI ORMONALI ▪ STATO DI HER2

(NST= Carcinoma invasivo non di istotipo speciale)

Va inoltre considerata la classificazione dei carcinomi mammari che, in base ai profili di espressione genica, permette di distinguere i sottogruppi di carcinomi mammari Luminali A, Luminali B, HER2, e basal-like, a differente prognosi. La valutazione con l'immunoistochimica dei recettori per gli estrogeni e progesterone, dello stato di HER-2 e del Ki67, sembra essere in grado di riprodurre una classificazione corrispondente a quella dei profili genici. I diversi sottogruppi di carcinoma mammario prevedono differenti indicazioni terapeutiche sistemiche adiuvanti:

- Il sottotipo Luminale A si caratterizza generalmente per tumori di basso grado, buona prognosi, elevata sensibilità alla terapia ormonale ed una minore sensibilità alla chemioterapia. La terapia cardine è rappresentata dalla terapia ormonale.
- I sottotipi Luminali B (HER2 negativi) si caratterizzano per un fenotipo più aggressivo rispetto al precedente e con prognosi peggiore; il trattamento può prevedere la chemioterapia in aggiunta alla terapia ormonale.
- I Luminali B (HER2 positivi) prevedono chemioterapia più trastuzumab in aggiunta alla

ormonoterapia adiuvante; tale trattamento è in genere indicato nei tumori con dimensioni superiori a 0.5 cm oppure con linfonodi ascellari positivi.

- I sottotipi HER2 positivi, richiedono chemioterapia più trastuzumab, trattamento in genere indicato nei tumori con dimensioni superiori a 0.5 cm oppure con linfonodi ascellari positivi.
- Nei triplo-negativi il trattamento cardine è rappresentato dalla chemioterapia. Alcuni tipi istologici tra cui il carcinoma midollare, hanno una prognosi favorevole e se a linfonodi ascellari negativi, possono non richiedere trattamenti sistemici adiuvanti in assenza di ulteriori fattori di rischio.

L'ormonoterapia è indicata per le pazienti con tumori ormonoresponsivi, intendendo per questi la presenza di almeno ER-positivo (≥ 1%) oppure PgR positivo (≥ 1%). La presenza di recettori ormonali è un indice di maggiore differenziazione del tumore ed infatti la percentuale di risposta al trattamento ormonale, nei tumori con recettori positivi, raggiunge l'80%, mentre scende sotto al 10% nei tumori in cui sono assenti i recettori per gli estrogeni. Può

essere effettuata con antiestrogeni (Tamoxifene), inibitori delle aromatasi o ablazione ovarica (farmacologia o chirurgica). La chemioterapia prevede la somministrazione di cicli di polichemioterapia, cioè una associazione di più farmaci antiproliferativi; l'uso di antracicline risulta superiore allo schema CMF (ciclofosfamide, mitomicina, fluorouracile). Nella scelta del regime di chemioterapia, va tenuto in considerazione che i vantaggi in termini assoluti di una chemioterapia a base di antracicline rispetto al CMF sono proporzionali al rischio di ricaduta, per cui se questo è basso il reale vantaggio può essere minimo.

Diversi studi hanno dimostrato l'efficacia dell'anticorpo monoclonale anti-HER-2 Trastuzumab, impiegato dopo o assieme alla chemioterapia adiuvante. I vantaggi in termini di riduzione del rischio di recidiva è evidente in tutti i sottogruppi di pazienti indipendentemente dallo stato linfonodale e da altri fattori prognostici.

In casi selezionati la pianificazione della strategia terapeutica adiuvante può avvalersi di un test di gene-profiling (Oncotype-Dx) sul materiale istologico.

pN0 pN1mic	Triple negative		T≤0.5cm	Follow-up
			T≥0.5cm	Chemio
	HER2-enriched		T≤0.5cm	Follow-up
			T≥0.5cm	Chemio + Trastuzumab
	Luminal B	HER2+	T≤0.5cm	OT
			T≥0.5cm	Chemio + Trastuzumab + OT
		HER2-	T<1cm	OT
			T 1-2 cm	- OT o - Chemio + OT se RE & RP <40%.
	Luminal A		T<3cm	OT
			T≥3cm	Chemio ± OT
pN+				Chemio ± OT + Trastuzumab
pN 1-3 No linfoadenectomia	Luminal A		≥ 65 aa T<3cm Altro da discutere in ambito GICO	OT

2.3 Terapia sistemica neoadiuvante

La terapia sistemica neoadiuvante, si riferisce al trattamento sistemico del carcinoma mammario eseguito prima della terapia chirurgica, che ha come obiettivo quello di ridurre le dimensioni del tumore primitivo, consentendo un intervento chirurgico conservativo e meno esteso. Inoltre, la terapia neoadiuvante consente anche una valutazione precoce dell'efficacia della terapia sistemica; in particolare la presenza o meno di malattia residua in seguito a terapia neoadiuvante rappresenta un rilevante fattore prognostico.

Le indicazioni sono di seguito elencate:

- Le pazienti con Carcinoma mammario localmente avanzato, indipendentemente dal sottotipo, sono ideali candidate per la terapia neoadiuvante perché nella maggioranza dei casi non suscettibili di chirurgia conservativa e per il rischio di recidiva.
- Le pazienti con Carcinoma mammario in stadio iniziale sono candidate idonee qualora la chirurgia conservativa non sia proponibile (rapporto nodulo mammella sfavorevole, adesione al muscolo pettorale o attrazione cutanea). Nei casi di pazienti affette da carcinoma triplo negativo (TNBC) o HER2+ la NACT è fortemente incoraggiata poiché sono di norma candidate a un trattamento chemioterapico post-chirurgico, e perché questi sottotipi sono particolarmente sensibili alle cure.

Oltre agli obiettivi clinici, la terapia neoadiuvante rappresenta un modello di valutazione predittiva, grazie alla disponibilità di campioni pre e post terapia e grazie alla precoce evidenza di efficacia di cura, valutata in base al conseguimento della risposta patologica completa. Prima di qualsiasi terapia neoadiuvante è raccomandata una valutazione istopatologica tramite biopsia, con determinazione dello stato recettoriale ormonale e di HER2.

Sono principalmente tre le opzioni di trattamento sistemico utilizzate:

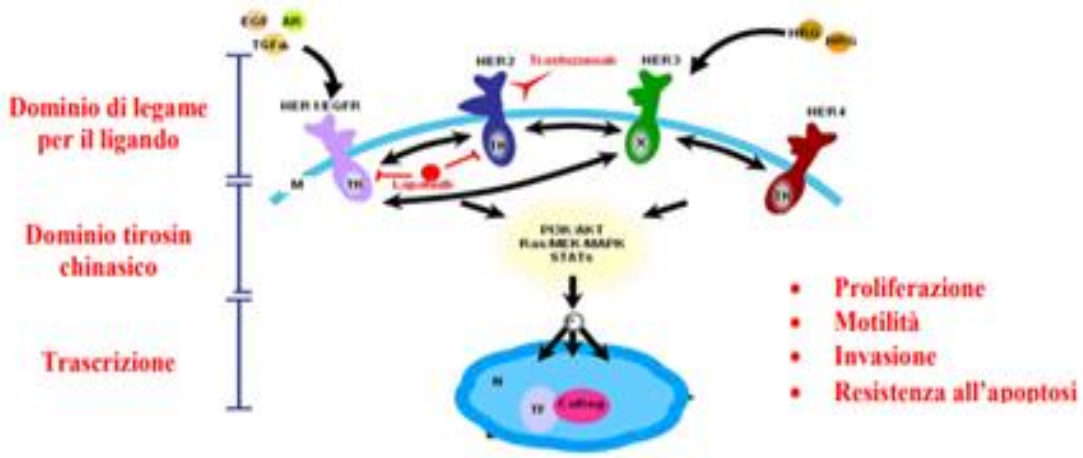
- Chemioterapia: si tratta di una terapia "senza bersaglio", i regimi comunemente usati per le pazienti HER2- negativa includono regimi a base di antracicline e ciclofosfamide seguiti o preceduti da un taxano, accanto ai regimi senza antracicline, proposti nei casi di malattia cardiaca, età avanzata, e in presenza di fattori di rischio cardiaco. I farmaci chemioterapici mostrano diversi meccanismi d'azione, la maggior parte uccide la cellula tumorale danneggiandone il DNA o bloccandone la sintesi.

- Terapia biologica: si tratta di una terapia a bersaglio molecolare, in quanto colpisce selettivamente uno specifico target, bloccando esclusivamente le cellule tumorali che ne sono portatrici. I progressi nella biologia molecolare consentono di studiare la differente espressione dei geni coinvolti nelle neoplasie (genomica) e delle proteine da essi prodotte (proteomica) al fine di determinare un dettagliato profilo molecolare delle neoplasie. La conseguente applicazione clinico-terapeutica di questi studi sta già consentendo di personalizzare le terapie in base alla

caratterizzazione biomolecolare del tumore, utilizzando farmaci selettivi che agiscono sui differenti bersagli, colpendo in questo modo, le singole molecole alterate (fattori di crescita, recettori, enzimi…) responsabili della crescita e della diffusione incontrollata delle cellule tumorali, della loro resistenza alle terapie tradizionali e della produzione di nuovi vasi sanguigni. I farmaci a bersaglio molecolare comprendono:

- farmaci antiHER2 (Herceptin): possono essere trattati con queste terapie solo i tumori che esprimono sulle proprie cellule il recettore HerbB2 (HER2) un recettore di membrana ad attività tirosin-chinasica, appartenente alla famiglia dei recettori per il fattore di crescita epidermico (Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR e simili) a cui normalmente si lega un fattore di crescita che induce la replicazione delle cellule bersaglio. Il Trastuzumab è un anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato con specificità per il dominio extracellulare dell'HER2, generalmente possiedono la parte costante di natura umana, mentre la parte che riconosce l'antigene è di origine murina (solo il 5-10%). HER2 attiva molteplici vie di segnale intracellulari comprese quelle che coinvolgono fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato chinasi (PI3K), e

MAP chinasi (MAPK). Herceptin riduce la trasmissione del segnale attraverso queste vie, promuovendo l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi.



Vie di segnale di HER2 E Target Therapy

Data questa loro struttura e l'elevata specificità, questi farmaci presentano una tossicità decisamente inferiore rispetto alla maggior parte dei chemioterapici convenzionali.

- Inibitori delle chinasi ciclina dipendente (inibitori di CDK): CDK è una proteina che favorisce la crescita delle cellule tumorali. Gli inibitori di CDK bloccando questa proteina inducono la morte delle cellule tumorali.

- Bevacizumab: un farmaco che distrugge i nuovi vasi sanguigni che portano ossigeno e nutrimento al tumore. Il Bevacizumab è approvato nel trattamento della neoplasia mammaria HER2 negativa in fase avanzata in associazione alla chemioterapia.

Caratteristiche peculiari e vantaggiose di questi nuovi farmaci sono rappresentate, pertanto, dall'azione selettiva su particolari substrati delle cellule tumorali; dalla modesta insorgenza di effetti indesiderati anche nel caso di impiego prolungato nel tempo e dalla possibilità di utilizzo in associazione con terapie tradizionali. Per contro, questi nuovi farmaci a bersaglio presentano importanti restrizioni al loro impiego determinate dal loro spettro d'azione che è ovviamente limitato a quei sottogruppi di tumori che presentano specifiche alterazioni molecolari.

- Terapia ormonale: Consiste nella somministrazione di farmaci che bloccano l'attività degli Estrogeni, fattori coinvolti nell'insorgenza delle neoplasie mammarie.

Non tutte le donne affette da Carcinoma della mammella possono beneficiare di tale terapia; sono candidate al trattamento soltanto quelle pazienti la cui neoplasia presenta espressione dei recettori ormonali (Recettori per estrogeni e progesterone) e spesso raccomandata nelle pazienti con controindicazioni alla chemioterapia. I farmaci utilizzati comprendono Antiestrogeni

(Tamoxifene), Inibitori delle Aromatasi (Anastrozolo, Letrozolo, Exemestane), LH-RH analogo (Leuprorelin, Goserelin, Triptorelin).

Il profilo biologico andrà a definire la terapia neoadiuvante da somministrare in maniera analoga a quanto già osservato per la terapia adiuvante post-chirurgica. Le pazienti che ricevono un trattamento neoadiuvante saranno sottoposte a periodiche valutazioni cliniche per valutare la risposta e assicurarsi che il tumore non progredisca.

Capitolo 3

TIL (Tumor-infiltrating lymphocytes)

3.1 Generalità e validità clinica

Il sistema immunitario svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi tissutale, che si esplica attraverso una continua immunosorveglianza e l'innesco di una reazione infiammatoria, che coinvolge l'attivazione coordinata di mediatori cellulari appartenenti alle compagini innata e adattativa.

Il processo carcinogenetico induce un'alterazione di tale equilibrio e l'avvio di una risposta immunitaria; in situazioni in cui l'eliminazione è incompleta, la trasformazione neoplastica delle cellule è in grado di sfuggire al controllo immunitario. Questo processo è stato meglio concettualizzato dalla teoria dell'immunoediting del cancro, che definisce la progressione maligna sulla base delle interazioni tra tumore e cellula immunitaria in tre fasi:

- Eliminazione, definita anche "di immunosorveglianza" include una risposta immunitaria sia di tipo innato che acquisito. La risposta immunitaria antitumorale ha inizio a causa della crescita e differenziazione del tumore. Esso va incontro a rimodellamento

stromale causando dei danni all'architettura tissutale circostante. Il tessuto danneggiato o il microambiente tumorale in via di formazione rilascia segnali pro-infiammatori che reclutano le cellule tipiche dell'immunità innata (cellule natural killer, cellule T natural killer, macrofagi, cellule dendritiche) nel sito ove risiede il tumore. Durante questa fase le cellule NK sono stimolate a infiltrare il tumore e producono IFN-gamma. Le cellule NK infiltranti il tumore reclutate insieme ai macrofagi producono l'interleuchina 12 e l'interferone-gamma, che uccide le cellule tumorali per mezzo di meccanismi citotossici. La maggior parte delle cellule tumorali è distrutta in questa fase; alcune di loro tuttavia sopravvivono e sono capaci di raggiungere un equilibrio rispetto alla risposta immunitaria.

- Equilibrio, a questo punto le cellule tumorali sopravvissute alla fase di "eliminazione" sono selezionate (in base ad un fenotipo non immunogenico) e crescono ulteriormente, emergono quindi nuove varianti di cellule tumorali, parallelamente a diverse mutazioni che contribuiscono all'eterogeneità tumorale insieme all' aumentata capacità di resistere alla risposta immunitaria,
- Fuga, i cloni tumorali selezionati durante la fase di equilibrio evadono totalmente le difese immunitarie dell'organismo, attraverso meccanismi

multipli: riduzione o perdita dell'espressione sulla superficie cellulare di molecole HLA di classe I e conseguente mancato riconoscimento della cellula da parte dei linfociti T citotossici; riduzione nell'espressione di antigeni tumorali immunogenici e assente espressione di molecole co-stimolatorie; produzione di molecole che inibiscono direttamente la funzione macrofagica e linfocitaria.

La composizione delle cellule coinvolte nell'immunità innata e adattativa varia tra i diversi tipi di tumore o a seconda degli organi interessati; diversi studi hanno dimostrato un'associazione significativa tra la presenza di specifici sottogruppi di cellule immunitarie e la risposta clinica, mostrando come l'immunità adattativa mediata dai linfociti T e B costituisca la base fondamentale per efficaci risposte antitumorali.

Lo sviluppo e la progressione dei tumori maligni sono quindi caratterizzati da una interazione con le cellule del microambiente tumorale, incluse le cellule immunitarie infiltranti.

3.2 *L'immunoterapia nella pratica clinica*

Il campo dell'immunoterapia applicato alla cura dei tumori sta vivendo un momento di grande trasformazione.

L'idea, avanzata alla fine del XIX secolo per merito del grande fisiologo tedesco Paul Erhlich, secondo la quale attraverso una modulazione della risposta immunitaria del paziente sia possibile attaccare le cellule tumorali, sta diventando una concreta realtà.

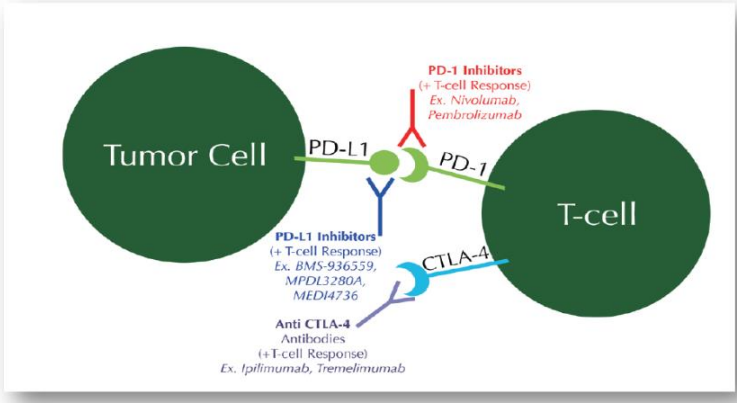
Diversi sono gli approcci terapeutici, ma certamente quello più interessante è quello che si basa sull'impiego di cellule effettrici del sistema immunitario (immunoterapia cellulare), armate in modo selettivo contro le cellule tumorali. Tale approccio prescinde dall'uso di farmaci citotossici, la tradizionale chemioterapia antiblastica.

Da questo punto di vista, l'applicazione dell'immunologia alla cura dei tumori, per la prima volta, offre la possibilità di curare i tumori senza l'uso di farmaci citotossici, riducendo le complicanze, a breve e a lungo termine, dell'uso di questi farmaci.

Certamente occorre mantenere il senso critico, necessario per comprendere a fondo il profilo di tossicità di queste terapie cellulari, che, per quanto diverso dalla chemioterapia, appare non trascurabile.

Esempio esplicativo è rappresentato dall'applicazione dell'immunoterapia nell'ambito dei tumori polmonari. A differenza delle tradizionali chemioterapie, ma anche della terapia biologica, l'immunoterapia rappresenta

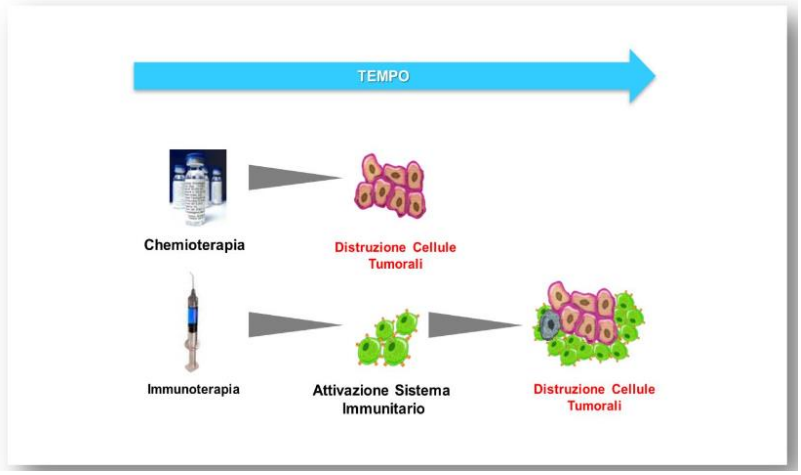
una strategia “rivoluzionaria”. Le cellule tumorali esprimono spesso recettori cellulari, in particolare PD-L1, che si legano alle cellule regolatrici della risposta immunitaria dell’ospite, attraverso il recettore PD-1,inibendole. Attraverso la regolazione di questi complessi recettoriali è possibile riattivare il sistema immunitario dell’ospite e consentirgli di riconoscere e distruggere le cellule tumorali.



Numerosi inibitori di tali recettori, in particolari anticorpi monoclonali inibitori di PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) e PD-L1(atezolizumab, durvalumab, avelumab), sono stati sviluppati o sono attualmente oggetto di studi clinici in diversi setting di trattamento e per i diversi istotipi di tumori del polmone. Il nivolumab, un inibitore di PD-1, ha recentemente ricevuto l’approvazione da parte degli enti regolatori italiani (AIFA) ed è attualmente disponibile e rimborsato dal SSN italiano per il trattamento di seconda linea dei pazienti affetti da tumori polmonari con istotipo squamoso dopo il fallimento di una precedente chemioterapia a base di platino.

Per i pazienti affetti da adenocarcinoma, invece, rimane disponibile sul territorio italiano un programma di uso compassionevole che consente l'accesso alla terapia con nivolumab in attesa della sua rimborsabilità da parte di AIFA. L'efficacia di nivolumab si è dimostrata superiore rispetto a quella della chemioterapia tradizionale in seconda linea (due recenti studiclinici hanno confrontato direttamente nivolumab con docetaxel, dimostrando la maggiore efficacia di nivolumab in termini di sopravvivenza globale). L'efficacia della immunoterapia si associa anche ad una sua maggiore tollerabilità che consente un miglioramento della qualità di vita ed una reale cronicizzazione della malattia. Particolare attenzione deve essere tuttavia posta al rischio di polmoniti da farmaco, che sebbene non frequenti, possono rappresentare un effetto collaterale limitante in particolari categorie di pazienti a maggiore rischio, come ad esempio pazienti con storia di polmoniti recidivanti.

Altra peculiarità del meccanismo di azione alla base della immunoterapia è rappresentato dal tempo necessario per osservare i risultati di tale trattamento, due volte più lungo rispetto alla chemioterapia tradizionale.



Sebbene al momento non esista un fattore che possa predire la risposta della malattia alla immunoterapia, come ad esempio avviene per la mutazione di EGFR nei confronti della terapia con gli inibitori di EGFR, dalle evidenze di alcuni degli studi clinici condotti fino ad ora sembrerebbe emergere una correlazione con l'elevata positività recettoriale del PD-L1. Al momento, il test per la ricerca della positività di PD-L1 non viene eseguito di routine nella pratica clinica e può essere effettuato solo nell'ambito dei protocolli sperimentali con farmaci immunoterapici laddove richiesto. In questo momento molti sono i protocolli di ricerca aperti in varie Istituzioni italiane per testare il ruolo della immunoterapia in prima linea di trattamento. Gli studi sono di tre tipi:

1) Immunoterapico anti PD-1/PD-L1 come agente singolo verso la chemioterapia standard sia nel carcinoma squamoso, sia nell'adenocarcinoma.

2) Immunoterapico combinato con la chemioterapia vs la chemioterapia standard.

3) Immunoterapico anti PD-1/PD-L1 combinato con un altro immunoterapico anti CTLA-4 vs la chemioterapia standard.

L'immunoterapia, innovativa strategia terapeutica, ha già rivoluzionato la storia di altre neoplasie un tempo incurabili, oltre i tumori polmonari, come il melanoma, i tumori di testa-collo.

Per tale ragione la valutazione dell'infiltrato infiammatorio è frequentemente fornita nel report istopatologico come criterio prognostico nel melanoma, nel carcinoma colon-rettale e carcinoma uroteliale.

3.3 L'immunoterpia nel carcinoma mammario

Nel carcinoma mammario l'immunoterapia, che ha stentato a decollare, sta finalmente dimostrando la sua efficacia anche nel carcinoma mammario.

Lo scorso ottobre 2018, sono stati presentati al congresso dell'European Society of Medical Oncology (ESMO), pubblicati in contemporanea dal New England Journal of Medicine, i primi dati dello studio IMpassion130 presentato: l'aggiunta dell'immunoterapico atezolizumab alla chemioterapia con nab-paclitaxel ha determinato un aumento della sopravvivenza libera da progressione di malattia in tutte le pazienti, e in particolare in chi presentava

alti valori del marcatore PD-L1 (contro cui è diretto atezolizumab), con una differenza di circa 10 mesi rispetto alla sola chemioterapia (25 rispetto a 15).

Da qualche anno sappiamo che i tumori mammari triplo negativi che vengono infiltrati dai linfociti (cellule del sistema immunitario, ndr.) hanno una prognosi migliore degli altri, a sostegno delle concrete possibilità di impiego dell'immunoterapia.

La determinazione morfologica dei linfociti infiltranti il tumore (TIL) sta guadagnando terreno in funzione delle evidenze che suggeriscono la rilevanza clinica di questo biomarcatore immunologico, definendo la densità TIL fortemente predittiva nel contesto della risposta alla chemioterapia neoadiuvante (NACT).

I sottotipi molecolari con maggiore quantitativo di infiltrato infiammatorio e significativamente correlati all'outcome clinico sono i TNBC e gli HER2+, per i quali sarebbe auspicabile introdurre la valutazione clinica del TIL.

Nell'analisi si fa riferimento alle linee guida definite dall'International TILs Group 2014 sulla valutazione dei TILs e successiva revisione 2018 da parte dell'International Immuno-Oncology Biomarker Group, con particolare riferimento alla terapia neoadiuvante.

3.4 Raccomandazioni metodologiche per la valutazione dei TIL nel carcinoma mammario

1. I TIL devono essere riferiti al compartimento stromale (%TIL stromali). Il denominatore utilizzato per determinare la percentuale di TIL stromale è l'area del tessuto stromale (l'area occupata da cellule infiammatorie mononucleate sull'intera area stromale intratumorale), non il numero di cellule stromali (la frazione di nuclei stromali totali che rappresentano i nuclei delle cellule infiammatorie mononucleate)
2. I TIL dovrebbero essere valutati entro i margini del tumore invasivo.
3. Escludere i TIL al di fuori del bordo del tumore e intorno al DCIS e ai lobuli normali.
4. Escludere i TIL nelle zone tumorali con artefatti, necrosi e ialinizzazione regressiva.
5. Tutte le cellule mononucleate (compresi linfociti e plasmacellule) devono essere valutate, sono da escludere invece i leucociti polimorfonucleati.
6. Una sezione (4-5 μm, ingrandimento ×200-400) per paziente è considerata sufficiente.

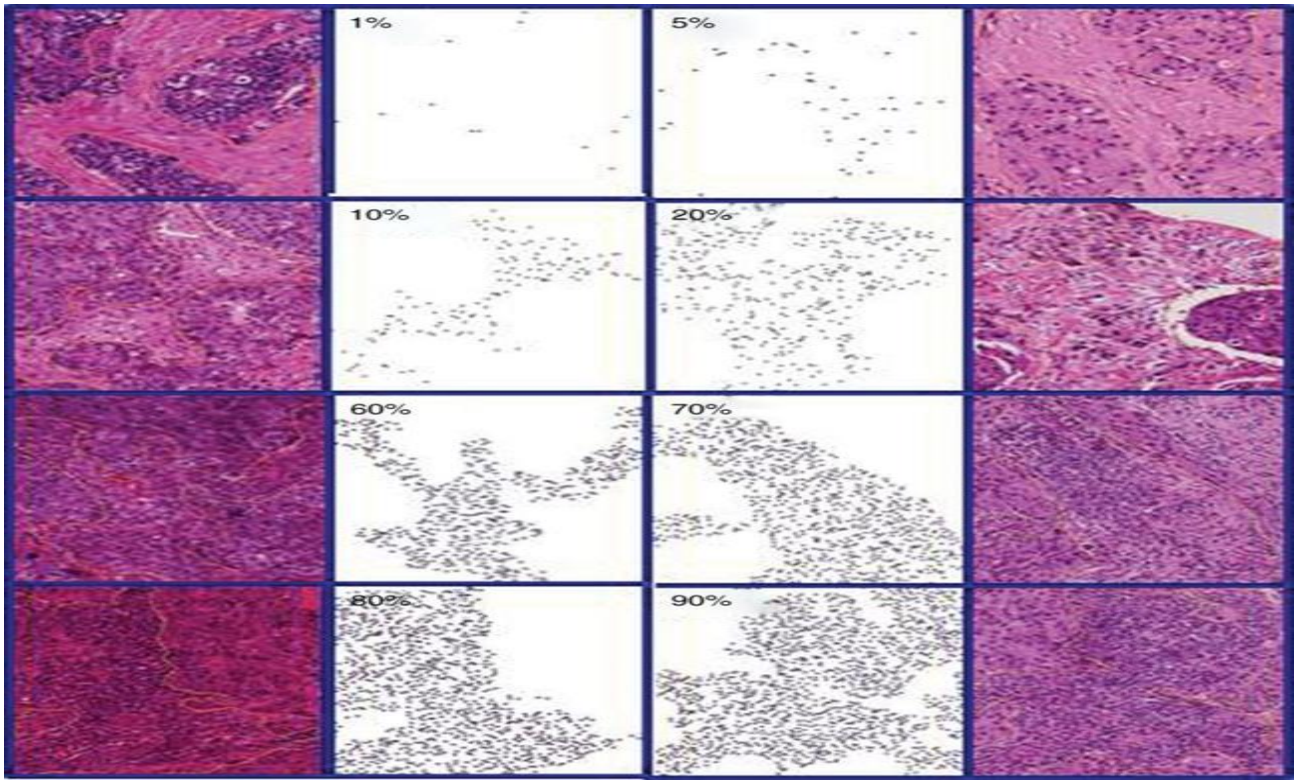
7. Preferire preparati relativi al pezzo operatorio (full-face H&E) ad agobiopsie.
8. Escludere dalla valutazione l'infiltrato infiammatorio sito al di fuori dei bordi del tumore (flogosi perilobulare) o intorno ad una eventuale componente intraduttale associata
9. I TIL dovrebbero essere valutati come un parametro continuo. La percentuale di TIL stromali è un parametro semiquantitativo per questa valutazione. I linfociti tipicamente non formano aggregati cellulari solidi, pertanto per la valutazione dei valori percentuali, è necessario tenere conto del modello di crescita dissociata dei linfociti.

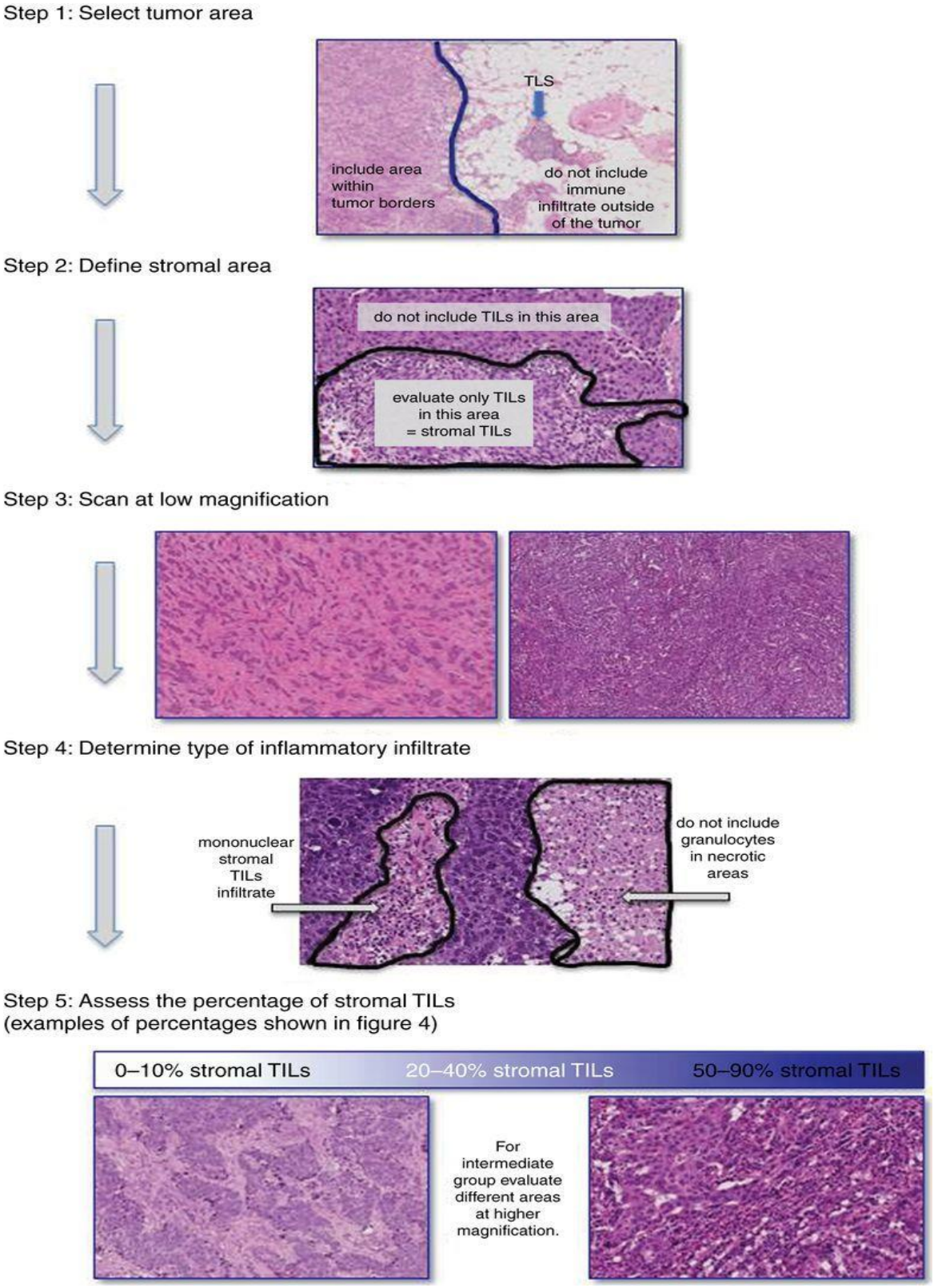
3.5 Approccio operativo

Il primo passo nella valutazione dell'infiltrato linfocitario tumorale consiste nella definizione dell'area da considerare: va tenuto in considerazione l'infiltrato presente entro i bordi della neoplasia, includendo nella valutazione l'infiltrato sul fronte di avanzamento. La porzione al di fuori dell'area tumorale (presente frequentemente in corrispondenza di tessuto mammario sano adiacente o di una eventuale componente intraepiteliale) va esclusa. Il preparato viene valutato inizialmente a basso ingrandimento, focalizzandosi

sul compartimento stromale, ovvero sull'infiltrato compreso nello stroma interposto tra gli elementi neoplastici. Sotto il profilo prettamente biologico l'infiltrato intratumorale, a contatto diretto con le cellule neoplastiche, sarebbe quello clinicamente più rilevante; a scopo diagnostico però i TIL stromali sono risultati essere considerevolmente più efficaci. I motivi principali sono che i TIL intratumorali sono tipicamente presenti in numero inferiore, più eterogenei e difficili da osservare su vetrini colorati con H & E (senza usare immunoistochimica o immunofluorescenza).

La valutazione viene espressa in termini percentuali, dall'assenza di cellule mononucleate (0%) alla totale occupazione del compartimento stromale da parte di un tappeto di linfociti e plasmacellule (100%). In caso di eterogeneità di intensità dell'infiltrato, verrà considerata una media ponderata valutando più campi ad ingrandimento maggiore (10x, 20x).


1%
5%
10%
20%
60%
70%
80%
90%



Approccio standardizzato per la valutazione dei TIL nel carcinoma mammario

3.6 Infiltrato linfocitario tumorale nella malattia residua post NACT

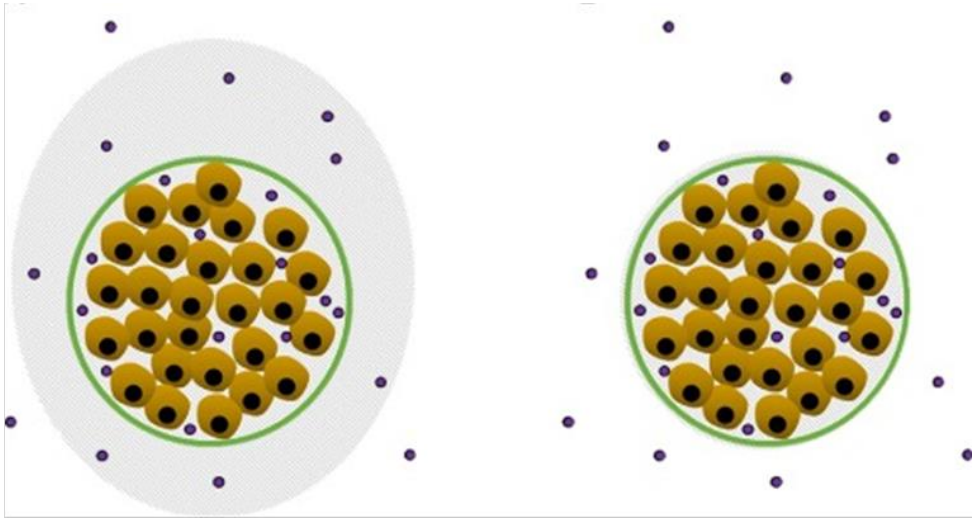
La chemioterapia primaria o NACT seguita da intervento chirurgico è oggi considerato lo standard di cura per BC localmente avanzato, ed è sempre più utilizzato nelle fasi precoci con l'obiettivo di ottenere una riduzione della massa tumorale, una migliore attuazione della fase chirurgica e la possibilità di conservazione del seno. Tale approccio consente inoltre l'opportunità unica di una valutazione "in vivo" della sensibilità al trattamento attuato; si definisce pCR, risposta patologica completa, l'assenza di carcinoma invasivo residuo dopo NACT. L'effetto antitumorale della chemioterapia è parzialmente esercitato attraverso la modulazione del sistema immunitario, in un processo noto come "morte cellulare immunogenica". La valutazione dei TIL nel tumore residuo dopo esposizione a chemioterapia potrebbe rappresentare dunque un'addizionale informazione prognostica, se comparata ai livelli iniziali, riflettendo la reazione del microambiente immunitario alla chemioterapia, ciò è stato supportato dall'osservazione che la somministrazione di chemioterapia determina l'attrazione e l'attivazione di TIL nel letto tumorale; se il tumore è sensibile alla chemioterapia, l'accumulo di cellule tumorali apoptotiche può innescare meccanismi immunitari che contribuiscono all'eliminazione delle cellule cancerose sopravvissute.

	TIL in primary untreated BC	TIL in RD
Selection of tumor area	Within boundaries of the invasive tumor.	Within the borders of the tumor area. How to define the tumor area of RD? – Area of regression according to radiological/gross/microscopic findings – Residual tumor bed defined as the largest cross-sectional area between residual invasive tumor cells.
	Include TILs at the invasive edge in the average assessment	
	Do not focus on hotspots	Do not focus on hotspots
	Do not include: DCIS, normal lobules, necrosis, large fibrous areas, crush artefacts, regressive hyalinization	Do not include: DCIS, normal lobules, necrosis, large fibrous areas, crush artefacts, regressive hyalinization. However, more challenges may be posed in the post-neoadjuvant setting since alterations such as regressive hyalinization, necrosis (sometimes replaced by aggregates of hystiocytes and cholesterol clefts), fibrous areas and stroma infiltrated by sheets of foamy hemosiderin-loaded histiocytes are often found after NACT.
Type of immune cells	All mononuclear cells, exclude polymorphonuclear leukocytes.	All mononuclear cells, exclude polymorphonuclear leukocytes.
Localization	Stromal TILs as the main parameter. Intratumoral TILs can be included for research purposes.	Stromal TILs as the main parameter. Intratumoral TILs can be included for research purposes.
	StrTILs definition: % of stromal areas occupied by mononuclear inflammatory cells.	StrTILs definition: % of stromal areas occupied by mononuclear inflammatory cells, within the boundaries of the residual tumor bed as defined by the RCB-index.
Scoring method	Continuous variable.	Continuous variable.
	Scan across tumor bed (50–100 ×) and then estimate average TILs across microscopic fields (200–400 ×).	Scan across tumor bed (50–100 ×) and then estimate average TILs across microscopic fields (200–400 ×).

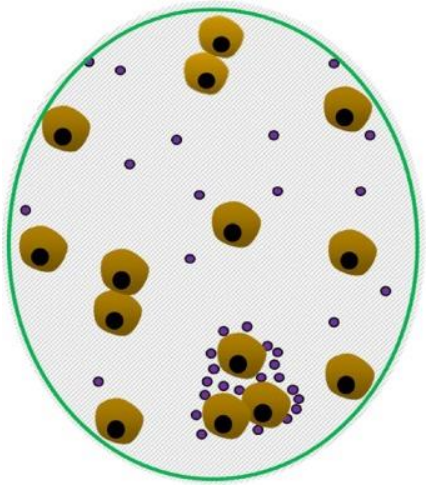
Raccomandazioni per la valutazione dei TIL nel carcinoma primario e nella malattia residua dopo NACT.

In accordo con le raccomandazioni previste per il carcinoma mammario primario, la valutazione TIL dovrebbe essere condotta sull'area delimitata dai confini del tumore invasivo primario. Nonostante l'uso di imaging, caratteristiche macroscopiche, e valutazione microscopica, l'area entro i confini del tumore primitivo non trattato, nel setting post NACT è difficile da delineare a causa della riduzione del tumore. Vi sono, tuttavia, due diverse aree del tessuto solitamente valutabili nell'impostazione post-NACT: la prima può essere considerata come "area di regressione" identificata attraverso riscontri radiologici, reazioni dello stroma e da segni di regressione alla valutazione microscopica indipendentemente dai confini definiti dalla presenza di cellule tumorali. La seconda possibilità è quella di concentrarsi sul "letto tumorale residuo", definito come la più ampia area trasversale tra le cellule invasive residue. Le raccomandazioni per BC non trattato sottolineano la rilevanza dei TIL localizzati nello stroma tumorale dell'area selezionata come parametro principale da considerare. I TIL intra-epiteliali possono essere inclusi, a scopo di ricerca, nella determinazione post-NACT, sebbene la valutazione possa rivelarsi più difficile senza strumenti aggiuntivi come l'IHC. Secondo le raccomandazioni disponibili, i TIL stromali dovrebbero essere valutati determinando la percentuale della superficie dello stroma tumorale dell'area selezionata che è occupata da cellule infiammatorie

mononucleate. Le aree escluse dalla valutazione includono: necrosi, fibrosi, stroma associato a carcinoma in situ o lobuli normali, grandi aree fibrose, artefatti e aree di ialinizzazione regressiva. Inoltre, uno dei pattern di risposta NACT potrebbe essere costituito da foci di cellule residue sparse o di cellule tumorali isolate, separate da ampie aree stromali. Gli infiltrati linfocitari possono essere trovati vicino ai foci tumorali e dispersi nello stroma dell'area selezionata, lontano dalle cellule invasive residue. Un'ipotesi non dimostrata è che solo i TIL adiacenti alle cellule / foci tumorali invasivi hanno una funzione immunologica rilevante, rispetto ai TIL trovati dispersi lontano dalle cellule tumorali, sollevando la questione se considerare l'intera superficie stromale o l'area attorno ai soli punti focali sparsi.



Restringimento del tumore come risposta a NACT. Superficie ombreggiata di grigio: area di regressione; linea verde: letto tumorale residuo; macchie viola: cellule infiammatorie mononucleate.



Cellularità tumorale ridotta come risposta a NACT, senza restringimento concentrico.

L'utilità clinica dei TIL come biomarker immunitario nella RD consisterebbe nella possibilità di discriminare i pazienti con prognosi infausta o intermedia, che sarebbero quindi indirizzati a trattamenti sistemici post-neoadiuvanti.

In caso di malattia residua dopo NACT possono essere delineati tre scenari principali:

- TIL da intermedio ad alto, che riflette la presenza di un'immunità anti-tumorale che deve essere mantenuta e /o potenziata.
- TIL basso, in cui l'assenza di una risposta immunitaria antitumorale comprometterebbe potenzialmente l'effetto della sola immunoterapia

- variazione TIL prima e dopo NACT, interpretato nel contesto del primo o del secondo scenario.

L'immunoistochimica (cromogenica o fluorescente) può successivamente fornire informazioni sulla composizione dei TIL e, parzialmente, sul loro stato funzionale. I microarrays tissutali (TMA) possono essere utili nella valutazione del fenotipo, tuttavia, il loro utilizzo per la caratterizzazione di sottopopolazioni TIL implica delle limitazioni (rischio di sottostima dell'eterogeneità intra-tumorale, perdita di materiale durante la lavorazione, ecc.), ma presenta ben noti vantaggi per lo screening di un numero elevato di casi. Nella fenotipizzazione TIL, i TMA sono adatti per analizzare i rapporti tra sottopopolazioni TIL (cellule T / cellule B o cellule CD8 + / cellule FOXP3 + ecc.) in quanto le sottopopolazioni possono essere contate sulla stessa superficie dello spot. La difficoltà più evidente consiste nel determinare l'area entro cui saranno determinati i TIL, poiché la superficie dell'area stromale non è identica in tutti gli spot TMA; ciò può essere superato con una stima assistita delle dimensioni dell'area in cui è stato effettuato il conteggio o mediante l'uso di griglie oculari che evidenziano l'area da valutare.

I metodi IHC di colorazione multipla di recente sviluppo, che risultano in 2-5 segnali di colore sulla stessa diapositiva, consentono la co-localizzazione di

diverse sottopopolazioni TIL in relazione alle cellule tumorali. Un profilo basato sull' IHC di sottopopolazioni di cellule immunitarie nel cancro al seno è in grado di identificare un gruppo di tumori altamente sensibili alla NACT; lo studio dei cambiamenti immunitari correlati alla chemioterapia e il profilo linfocitico della sottopopolazione del tumore residuo post-NCT permetterebbe la stratificazione prognostica.

Capitolo 4

PARTE SPERIMENTALE

4.1 Introduzione

Negli ultimi anni la ricerca scientifica si è focalizzata sul ruolo cruciale che il sistema immunitario riveste in ambito oncologico. Il carcinoma mammario è in grado di attivare il sistema immunitario, infatti, molti antigeni presenti sulla superficie delle cellule tumorali sono proteine-self in grado di stimolare i linfociti-T ed indurre una risposta immunitaria regolatoria. Le cellule immunitarie nel microambiente del carcinoma mammario possono influenzare e mediare parzialmente la risposta alla chemioterapia. La chemioterapia preoperatoria (neoadiuvante) in cui sono disponibili i tessuti pre e post-trattamento, fornisce l'opportunità di studiare i parametri immunitari basali associati alla risposta al trattamento e di valutare i cambiamenti nel microambiente immunitario.

Inoltre è stato individuato che l'intensità della risposta immunitaria tumorale influenza l'efficacia delle terapie oncologiche ed è correlata con una migliore prognosi. Alcuni carcinomi mammari presentano uno spiccato infiltrato linfocitario ed esso è stato recentemente proposto come un marker surrogato

di risposta immunitaria adattiva. Le evidenze accumulate fino ad ora mostrano dunque come l'estensione dell'infiltrato linfocitario nel tessuto tumorale, possa risultare fondamentale nella valutazione delle sezioni tumorali, attribuendo ai TILs un ruolo prognostico e potenzialmente predittivo nell'iter diagnostico.

L'obiettivo primario di questo studio è valutare l'infiltrato linfocitario tumorale in pazienti con carcinoma mammario sottoposte a terapia neoadiuvante, al fine di correlare la densità e la caratterizzazione TIL alla risposta al trattamento.

4.2 Materiali e metodi

E' stato condotto uno studio osservazionale retrospettivo su un campione clinico di 50 pazienti, selezionate dal database dell'Anatomia Patologica del P.O. "G. Bernabeo" di Ortona, Centro Senologico Specialistico certificato Eusoma operate per carcinoma mammario invasivo dopo essere state sottoposte a terapia neoadiuvante (indipendentemente dal subtipo immunomolecolare della neoplasia e quindi dal tipo di terapia sistemica somministrata, e indipendentemente dallo stadio). Il campione è stato suddiviso in 2 gruppi:

- Gruppo R0: costituito da 25 pazienti in cui l'esame istologico del campione operatorio documentava l'assenza di residuo carcinomatoso dopo terapia neodiuvante deponendo per una risposta patologica completa (R0). Le pazienti sono state discrimate in ordine cronologico consecutivo, regressivo a partire dal 31/12/2014.

Il campione con risposta completa include donne di età compresa tra i 43 e i 90 anni, età media 66,5 anni, mediana campionaria 57 anni, sottoposte a terapia neoadiuvante e in seguito a intervento chirurgico nel periodo intercorso tra il 2013 e 2014.

- Gruppo R1: costituito da 25 pazienti con residuo carcinomatoso dopo terapia neoadiuvante risposta parziale (R1) selezionate analogamente, in ordine cronologico consecutivo, regressivo dal 31/12/2014.

Il campione relativo a risposta parziale comprende donne di età compresa tra i 43 e 77 anni, età media 60 anni, mediana campionaria 57 anni, sottoposte a terapia neoadiuvante precedentemente al trattamento chirurgico, eseguito tra il 2013 e 2014.

I campioni sono stati anonimizzati. Per ciascuno è stato specificato, relativamente al campione bioptico (tru-cut o VABB) preoperatorio:

- istotipo sec. WHO 2012;

- grado istologico sec. Bloom-Richardson;

- fattori prognostici-predittivi (ER; PgR, Ki-67/MIB1; Ck5; HER2) e subtipo immunomolecolare (luminal-A; luminal-B; luminal B HER2-overexpressing; HER2+ non luminale triplo negativo);

- dimensione clinica del tumore (cT);

- stato linfonodale (cN)

- tipologia di trattamento sistemico neoadiuvante somministrato (ormoterapia/chemioterapia/terapia biologica).

Per tutti i 50 campioni (gruppo R0 e gruppo R1) si è proceduto, in seguito alla valutazione qualitativa/quantitativa dei TILs sui campioni bioptici fissati in formalina e inclusi in paraffina, colorati con ematossilina-eosina, in maniera centralizzata presso l'Anatomia Patologica dell'Ospedale G. Bernabeo di Ortona.

E' stato considerato l'infiltrato mononucleato (linfociti e plasmacellule) presente entro i bordi della neoplasia, limitatamente alla componente invasiva, compreso quello presente sul fronte di avanzamento tumorale. Le aree di necrosi, fibrosi e sclerosi presenti all'interno dell'area neoplastica sono state escluse dalla valutazione. L'infiltrato infiammatorio sito al di fuori dei bordi dell'area tumorale (presente frequentemente in corrispondenza di

tessuto mammario sano adiacente), cosi come l'infiltrato flogistico repertato attorno ad un'eventuale componente intraepiteliale associata non sono compresi nella valutazione.

Il preparato è stato valutato inizialmente a basso ingrandimento con particolare attenzione sul compartimento stromale. Nella valutazione è stato incluso l'infiltrato mononucleato (linfociti e plasmacellule) ed esclusi invece l'infiltrato granulocitario compreso nelle aree di necrosi tumorale e la flogosi secondaria a pregresse procedure bioptiche.

La presenza di infiltrato linfocitario stromale è stata riportata indicando la percentuale di stroma occupata dai linfociti: tali valori percentuali andranno da 0% (assenza di cellule mononucleate) a 100%, ovvero completa occupazione del compartimento stromale da parte di linfociti e plasmacellule. Al contempo l'infiltrato mononucleato stromale è stato gradato in lieve (compreso tra lo 0 e il 20%), moderato (tra il 21 e il 50%) o severo (il compartimento stromale sarà occupato da linfociti per oltre il 50%). Nel caso di eterogeneità di intensità dell'infiltrato linfocitario, è stata eseguita una media ponderata valutando più campi ad ingrandimento maggiore (10x,20x).

E' stata specificatamente segnalata la presenza/assenza di infiltrato infiammatorio mononucleato in corrispondenza del fronte di avanzamento tumorale (interfaccia tumore/tessuto sano), menzionandoli come TILs

periferici, e la presenza di infiltrato mononucleato intratumorale/intraepiteliale (ovvero a contatto diretto con le cellule tumorali) denominandoli TILs intraepiteliali.

Relativamente ai TILs periferici abbiamo aggiuntivamente segnalato la presenza di aggregati linfocitari follicolari. Occorre precisare che la valutazione dei TILs perifierici è risultata non sempre affidabile per le caratteristiche intrinseche del materiale bioptico stesso, ovvero per l'impossibilità di sapere sempre con certezza in quale zona della neoplasia ci si trovasse (centro versus periferia).

L'infiltrato infiammatorio presente sui preparati bioptici, dopo una prima valutazione morfologica, è stato tipizzato mediante colorazioni immunoistochimiche (CD3 per il riconoscimento dei linfociti T con sottopopolazioni CD4 e CD8; CD20 positivo nei linfociti B e CD138 per l'identificazione di plasmacellule).

La tipizzazione è stata performata solo sui campioni bioptici con un sufficiente residuo tissutale. Viceversa sono stati esclusi dalla tipizzazione fenotipica quelle biopsie in cui l'allestimento di ulteriori colorazioni immunoistochimiche avrebbe comportato l'esaurimento del campione biologico.

Dai preparati di tessuto bioptico fissati in formalina ed incluso in paraffina si sono ottenute sezioni dello spessore di 4 µm che sono state fissate su appositi vetrini porta-oggetto, i preparati così ottenuti sono stati asciugati in stufa a 37°C; si è successivamente proceduto alla sparaffinatura mediante trattamento con il solvente xilolo per 20 minuti, il solvente è stato eliminato con l'etanolo facendo percorrere ai vetrini la serie discendente degli alcoli (100°, 95°, 75° e 50°). Le indagini immunoistochimiche sono state eseguite sul materiale utilizzando i seguenti antisieri:

1. **Anti-CD3**: identifica l'antigene CD3 espresso dai linfociti T totali; Il CD3 è un co-recettore delle cellule T, un complesso di proteine transmembrana composto da tre catene distinte: una catena CD3γ, una catena CD3δ, e due catene CD3ε. La regione transmembrana delle catene CD3 è carica negativamente, in modo tale da consentire l'associazione di queste catene con le catene di TCR cariche positivamente; le code intracellulari delle molecole CD3 sono formate da un unico motivo conservato definito ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motife)* essenziale per la capacità di segnalazione del TCR. I linfociti T sono responsabili dell'immunità adattativa; durante la loro maturazione producono ed espongono in membrana il recettore per l'antigene chiamato TCR. Ciascun recettore

è in grado di riconoscere l'antigene in base alla sua struttura chimica; in particolare il TCR riconosce piccoli frammenti di proteine chiamati peptidi, solo se essi vengono presentati dalle molecole HLA di classe I o di classe II presenti sulla membrana plasmatica delle cellule APC. L'alta specificità nell'espressione dell'antigene, combinata con la presenza del CD3 in tutte le fasi di sviluppo della linea T, lo rende un utile marcatore immunoistochimico.

2. **Anti-CD4**: la glicoproteina CD4 è una proteina transmembrana presente sui linfociti T appunto detti *CD4* + o Helper. Rappresenta il corecettore coinvolto nell'attivazione dei linfociti T, riconosce infatti il complesso TCR-complesso MHC di classe II ed è necessario insieme con il CD3 nella trasduzione del segnale di riconoscimento antigenico. I linfociti T helper producono molecole proteiche, le citochine, fondamentali nell'attivazione di altre cellule del sistema immunitario quali i linfociti B, i linfociti T, i macrofagi, e cellule NK.

3. **Anti-CD8:** la glicoproteina CD8 è una proteina dimerica transmembrana presente sui linfociti T citotossici, interagisce con la porzione laterale del complesso recettore TCR-MHC di classe I, mentre la parte intracitoplasmatica trasduce un segnale attivatorio in

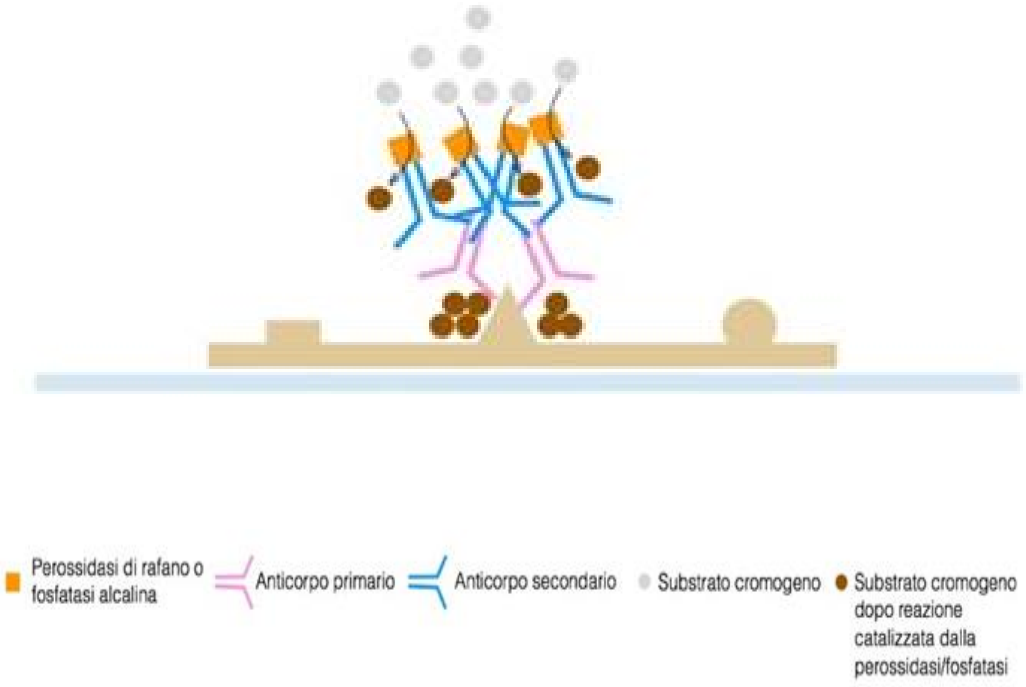
conseguenza del riconoscimento. Tali anticorpi discriminano cellule effettrici citotossiche.

4. **Anti-CD20:** l'antigene linfocitario CD20 è espresso sulla superficie di tutte le cellule B durante la loro differenziazione a partire dai pre-B e progressivamente aumentando in concentrazione durante il processo di maturazione. Si tratta di una proteina di membrana con quattro domini transmembrana, che svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella differenziazione delle cellule B.

5. **Anti-CD138**: la molecola di CD138 è una glicoproteina eparan solfato transmembrana, espressa in distinte fasi di differenziazione nelle cellule linfoidi, utilizzato in istochimica come marcatore per identificare la presenza di plasmacellule, cellule che si differenziano dalla cellula B sotto stimolazione dei linfociti T helper e dal riconoscimento diretto dell'antigene per cui sono specifiche.

La specificità della reazione antigene – anticorpo e la sensibilità di un marcatore enzimatico, sono combinate in un dosaggio immunologico indiretto che ci consente di quantificare una sostanza antigenica presente in sezioni istologiche del tessuto tumorale in esame. Un anticorpo primario viene fatto reagire con l'antigene, successivamente si aggiunge un anticorpo secondario coniugato specifico per l'anticorpo primario utilizzato in precedenza. L'

enzima converte il substrato cromogenico (DAB) in un prodotto insolubile che precipita in prossimità dell'anticorpo divenendo visibile al microscopio.



Per i casi con risposta patologica completa, è stata condotta un analisi dell'infiltrato infiammatorio su biopsia, nello specifico è stata valutata la presenza di linfociti T totali (CD3+), il rapporto CD4+ / CD8+, l'assenza (negatività) o la presenza (positività) di linfociti B e plasmacellule. I campioni con risposta patologica parziale sono stati esaminati rispettivamente su biopsia e sul pezzo operatorio, riportando per ciascuno la percentuale di

TIL stromale, la presenza di TIL periferici, TIL intraepiteliali, e relativa caratterizzazione molecolare.

Limitatamente al campione R1 le stesse valutazioni sono state effettuate anche sul residuo tumorale presente sul campione operatorio.

Dal referto istologico sono stati estrapolati:

- istotipo sec. WHO 2012;

- grado istologico sec. Elston-Ellis;

- fattori prognostici-predittivi (ER; PgR, Ki-67/MIB1; Ck5; HER2) e subtipo immunomolecolare (luminal-A; luminal-B; luminal B HER2-overexpressing; HER2+ non luminalee triplo negativo);

- dimensione microscopica del residuo tumorale (pT);

- stato linfonodale (pN).

L'infiltrato infiammatorio tumorale presente sui campioni chirurgici è stato oggetto delle medesime valutazioni morfologiche (valutazione qualitativa/gradazione e quantitativa dei TILs stromali; presenza/assenza TILs perifierici; presenza/assenza di TILs intraepiteliali) e immunomolecolari già performate sui corrispondenti campioni pre-operatori. La tipizzazione fenotipica dell'infiltrato infiammatorio con immunoistochimica (colorazioni

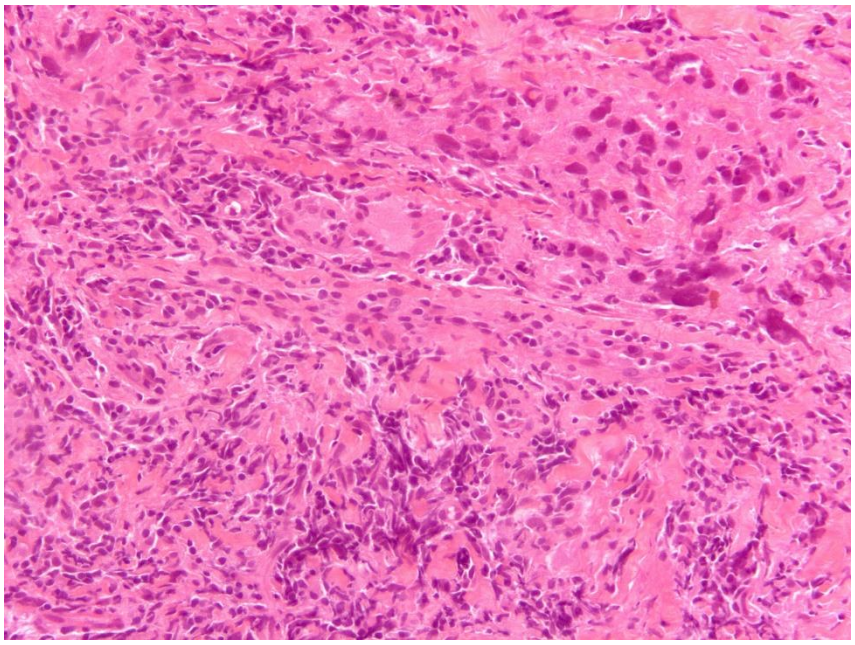
con CD3, CD4, CD8, Cd20 e CD138) è stata invece riservata esclusivamente a quei casi (5) in cui l'infiltrato infiammatorio era stato grado come moderato (3 casi) o severo (2 pazienti).

Capitolo 5

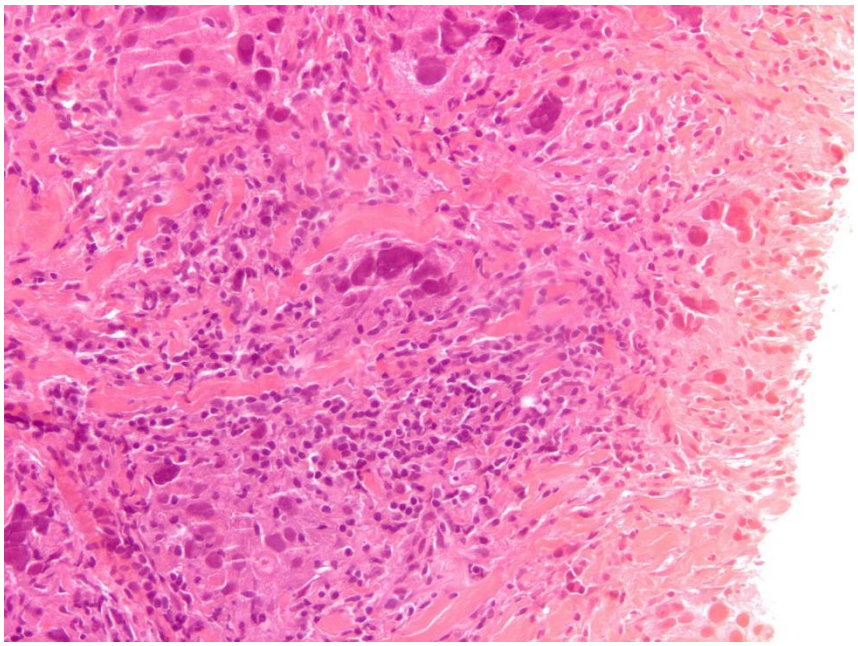
RISULTATI

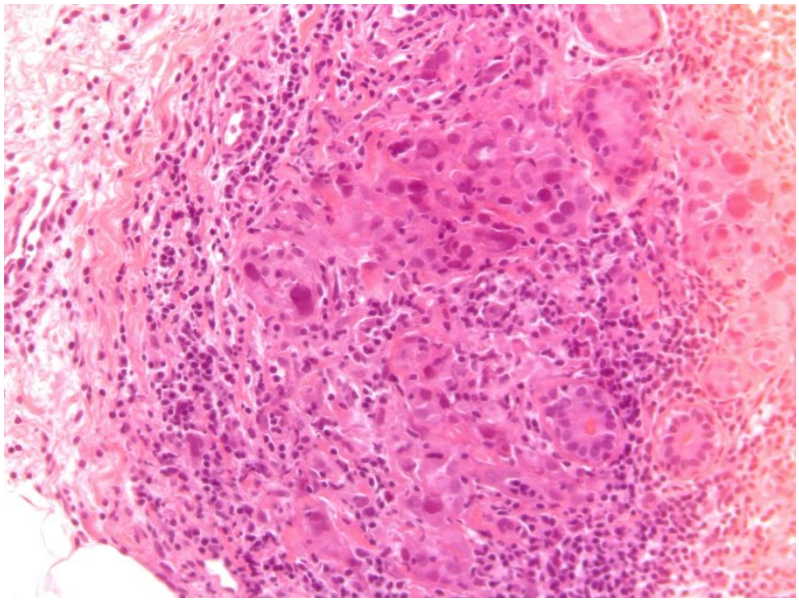
Il campione clinico relativo a risposta patologica completa (R0) comprende 23 carcinomi di tipo duttale infiltrante, NST/ NOS; 2 di tipo Medullary- like e midollare; il grado istologico è principalmente 2 (22 casi), la restante parte distinta in grado 1 (1 caso) e in grado 3 (2 casi). Sono state evidenziate 2 pazienti con subtipo molecolare Luminal-B, mentre il subtipo Luminal-B HER-2 overexpressing identificato in 7 pazienti, l'HER-2 overexpressing non luminale in 12 pazienti, Null in 3 ed infine Basal-like in un unico caso. La dimensione clinica del tumore compresa in prevalenza tra i 2 cm e i 5 cm (16 campioni), < 2 cm in 8 campioni e > 5 cm in un'unica condizione. La terapia neoadiuvante eseguita in funzione del subtipo molecolare, prevede la somministrazione di CHT in associazione con farmaco biologico e ormonoterapia (19 pazienti) o sola Chemioterapia (6 casi). La valutazione qualitativa/ quantitativa su biopsia in EE dell'infiltrato infiammatorio relativo al comparto stromale, si è dimostrata assente in soli 2 casi, lieve (≤ 20%) in 4 circostanze, mentre è risultata essere per la maggior parte di grado moderato (>20% ≤ 50%) e severo (> 50%) rispettivamente in 10 e 9 pazienti,

accompagnato da TIL periferico, e da TIL intraepiteliale in relazione a 10 e 12 casi.



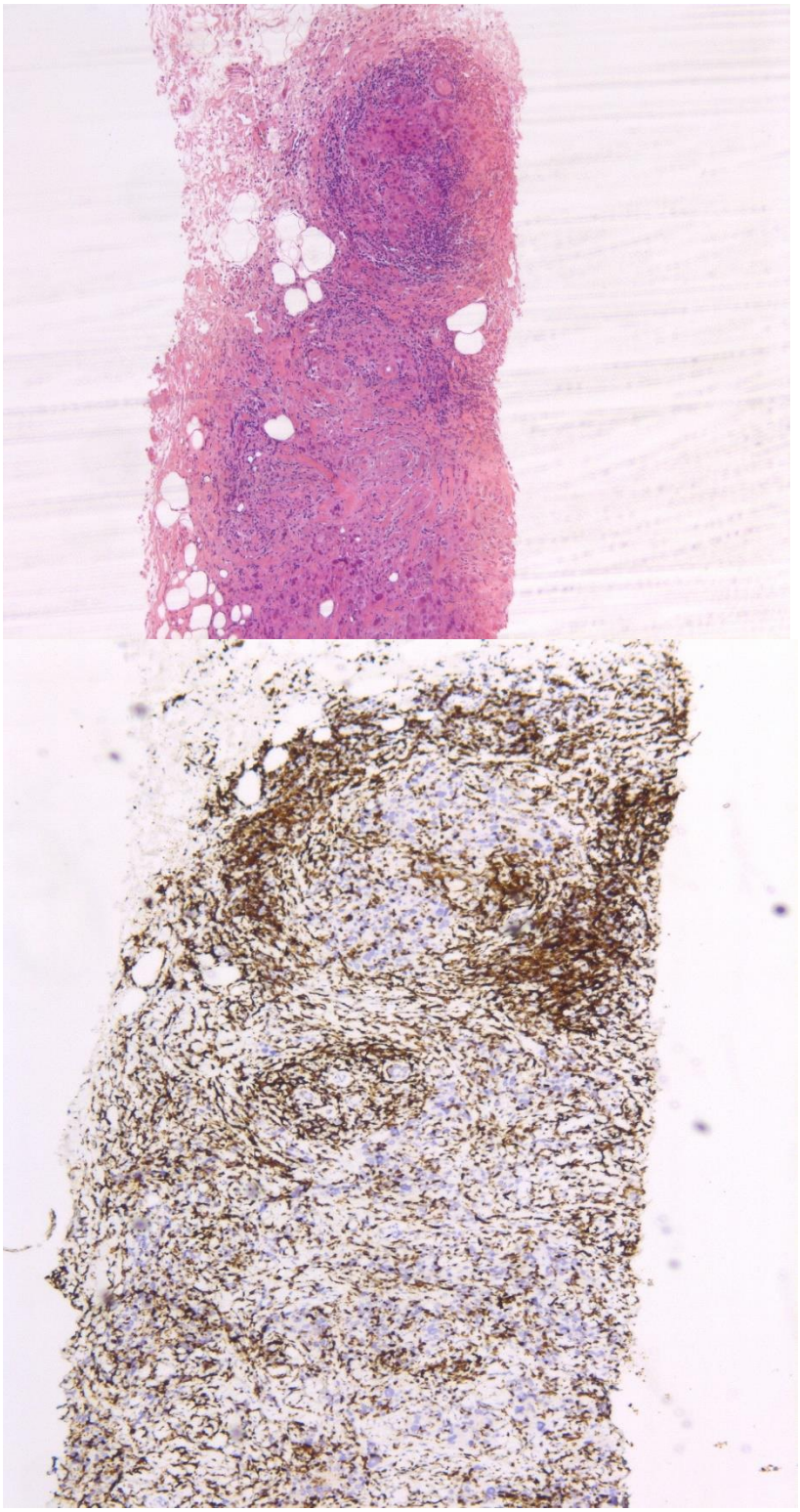
Campione R0 TILs stromali 90% Grado 3



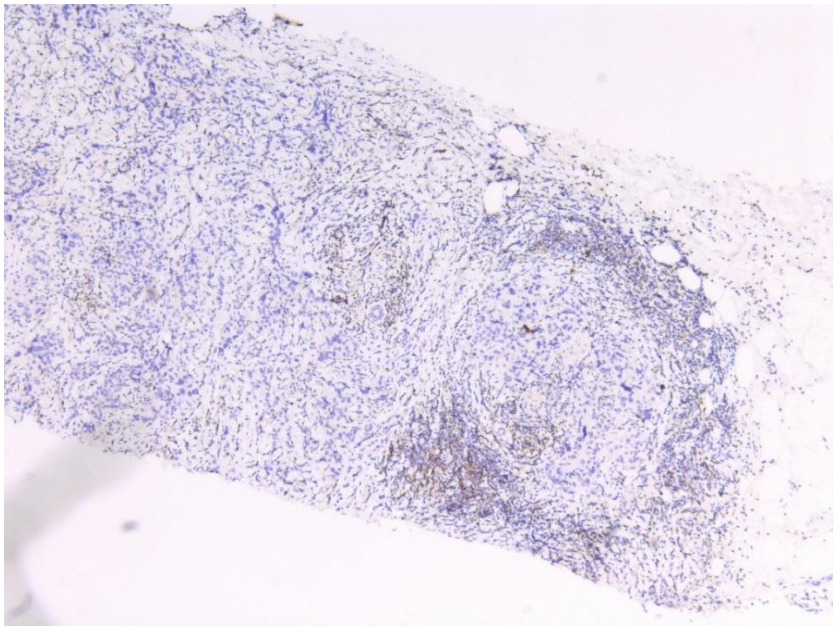


R0 TILs intraepiteliali

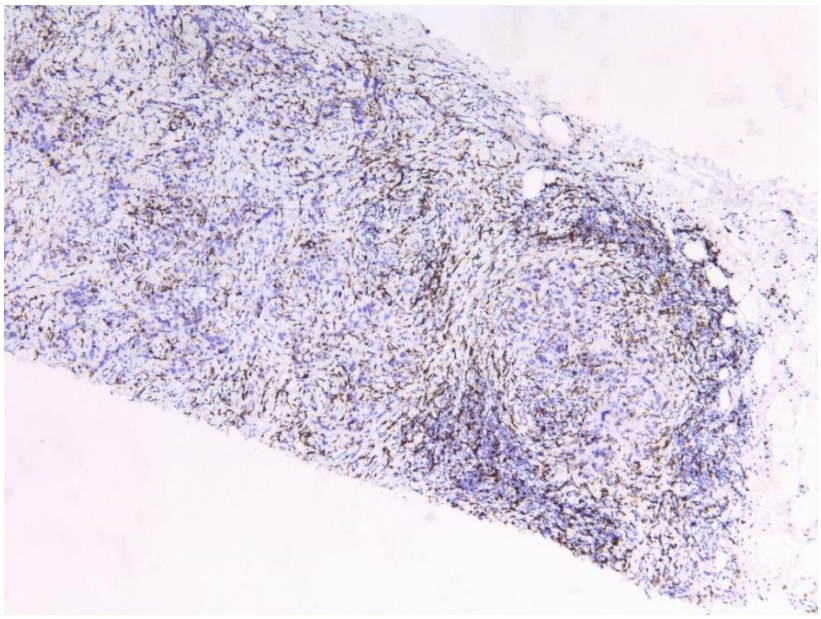
La tipizzazione in immunoistochimica ha evidenziato la presenza predominante di Linfociti T (CD3+) con un rapporto tra le sottopopolazioni CD4+/CD8+ che oscilla tra 1:2 e 1:6 sempre però a favore della componente CD8+ citotossica. L'associazione di Linfociti B e plasmacellule al letto tumorale non si è dimostrata uniforme, tuttavia in alcuni casi è stata osservata la formazione di aggregati follicolari.



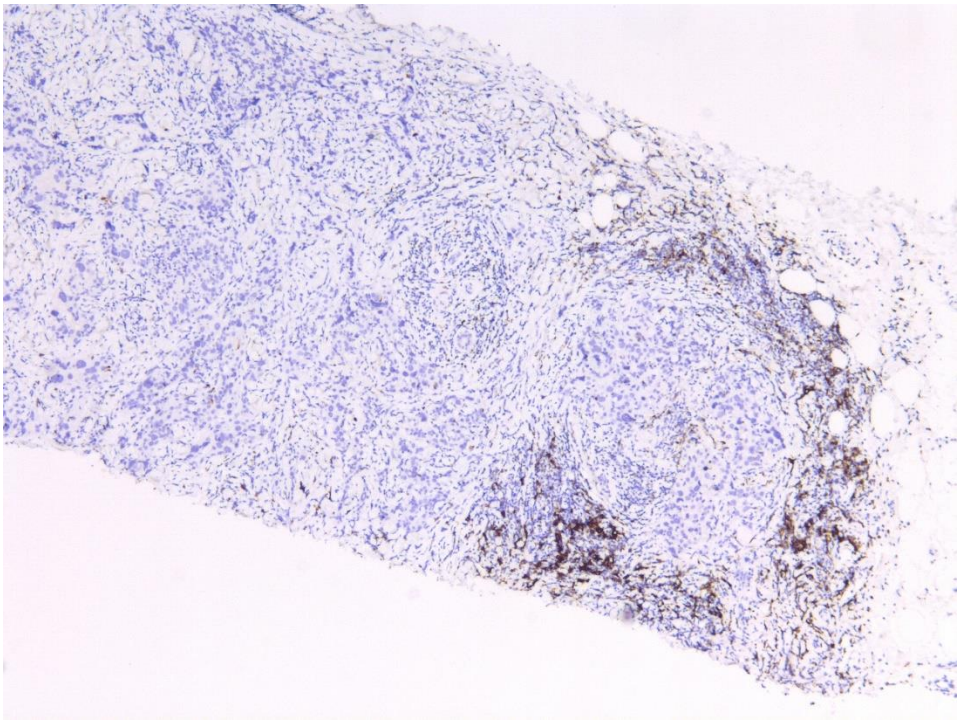
Linfociti T CD3+ in IHC



CD4+ (scarsi) in campione R0



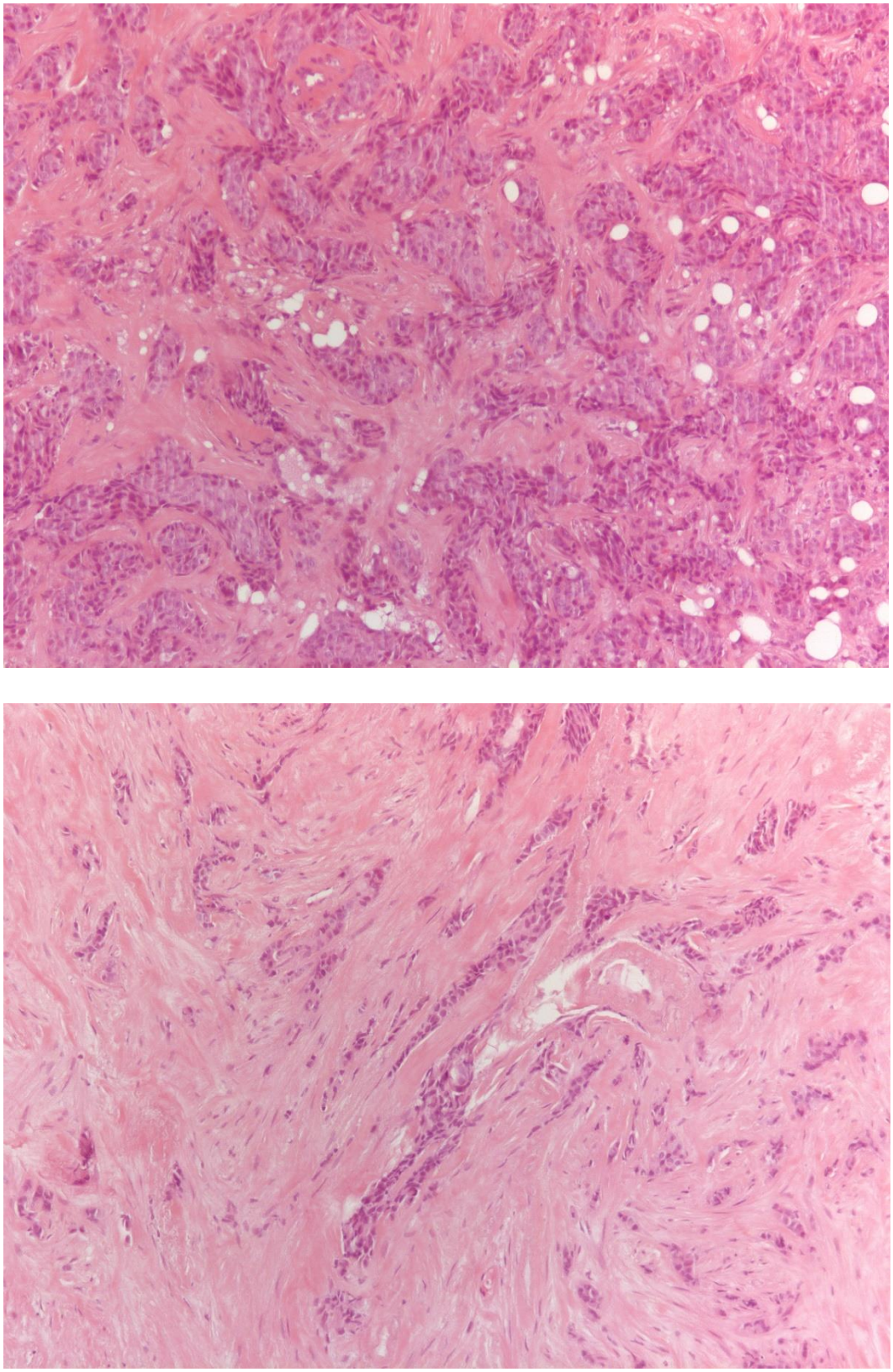
CD8+ in campione R0



CD20+ in campione R0

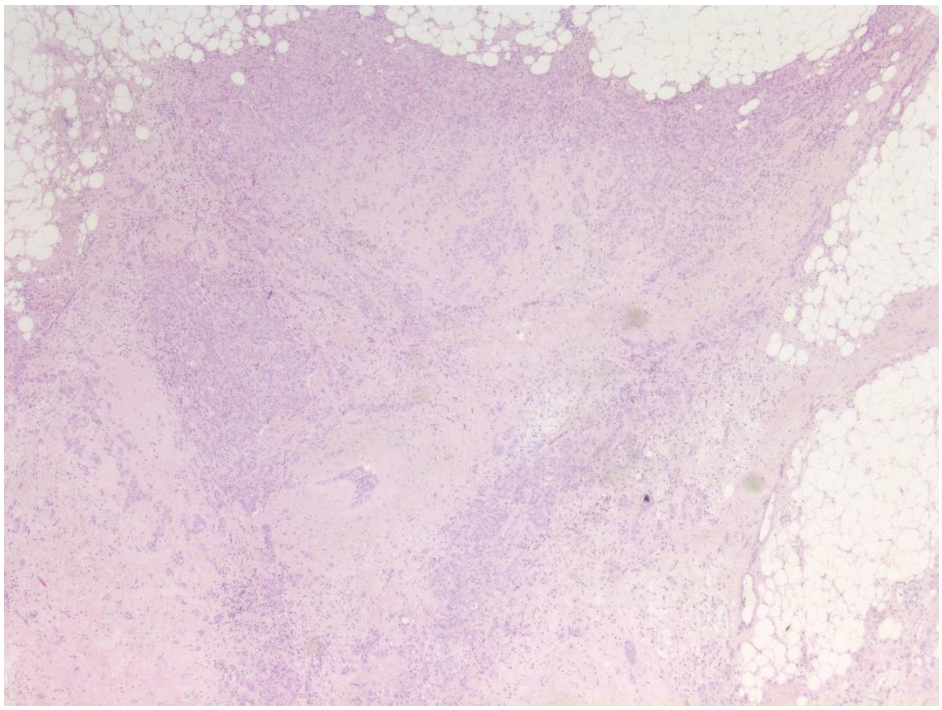
Dall'altra parte il campione R1, in cui non c'è stata risposta patologica significativa, include 20 Carcinomi di tipo duttale infiltrante, NST/NOS, 2 di tipo lobulare infiltrante e 3 di tipo speciale (due carcinomi tubulari e un carcinoma mucinoso); 9 campioni di grado istologico 1, 15 di grado 2 e uno solo di grado 3. Il subtipo immunomolecolare è risultato essere per 12 pazienti Luminal-A, in 7 casi Luminal-B e in 2 di tipo Luminal-B HER2-overexpressing, per un solo campione Null e in 3 condizioni Basal-like. Le dimensioni tumorali comprese principalmente tra i 2 cm e i 5 cm (16 casi), 7

campioni sono risultati essere di dimensione < 2 cm, mentre dimensioni > 5 cm riscontrate in 2 circostanze. La terapia neoadiuvante prevista comprende una terapia ormonale per 11 pazienti, Chemioterapia per 12 pazienti mentre in una 2 casi è stata utilizzata la combinazione di Herceptin CHT, farmaco biologico e terapia ormonale. Le caratteristiche dell'infiltrato infiammatorio sono state valutate prima su biopsia: 20 pazienti presentano un infiltrato ≤ 20%, nello specifico 12 mostrano un infiltrato assente, 3 di grado moderato (>20% ≤ 50%) e 2 pazienti di grado severo (> 50%). L'infiltrato intraepiteliale e periferico si è dimostrato essere assente per la quasi totalità dei campioni (23/25 casi).



Campione bioptico R1 con infiltrato stromale assente

Relativamente alla malattia residua dopo terapia neoadiuvante, la valutazione morfologica dell'infiltrato infiammatorio sul corrispondente campione operatorio non ha mostrato significative variazione in termini di intensità flogistica per i campioni con infiltrato assente (12 casi) e lieve (8 casi).



Campione operatorio R1 con infiltrato stromale assente

Particolare attenzione è stata rivolta ai 5 casi con un infiltrato infiammatorio stromale bioptico moderato (3 casi) e severo (2 casi). In questi 5 casi oltre alla rivalutazione morfologica dell'infiltrato nel campione chirurgico ne abbiamo

effettuato anche la tipizzazione immunoistochimica con CD3, CD4, CD8, CD20 e CD138.

Per i casi con TIls severo si è evidenziato, su campione chirurgico:

1) Si ripropone il quadro morfologico visto sulla biopsia, con infiltrato infiammatorio stromale di grado severo (>50%) costituito da linfociti T (CD3+) con rapporto CD4/CD8 a favore dei citotossici (rapporto 1:5), analogamente a quanto osservato nei campioni con risposta patologica completa.

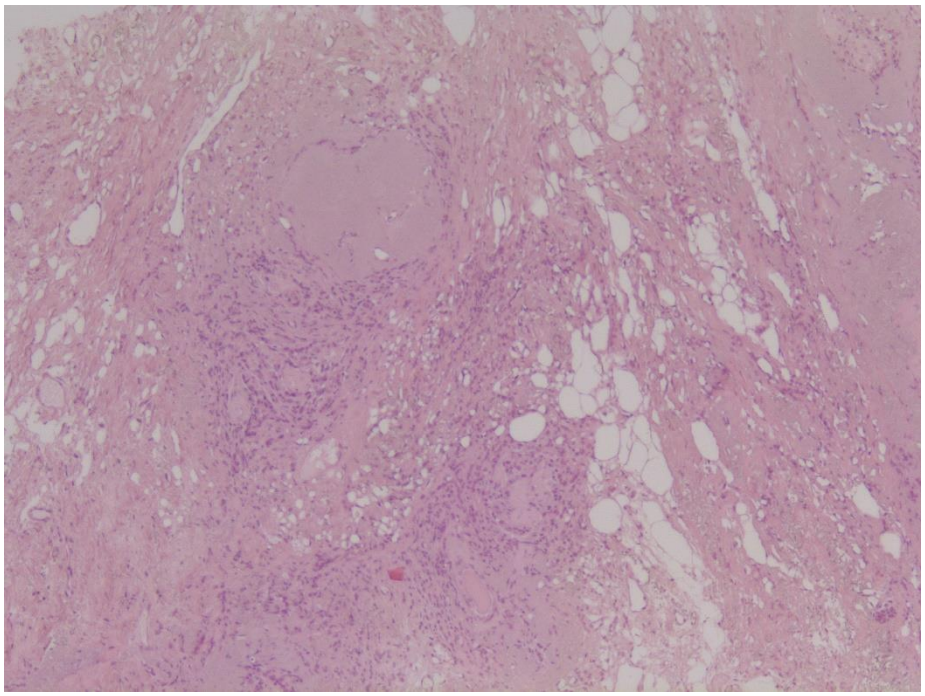
In questo caso il residuo tumorale era presente, ma di dimensioni contenute (0,5 cm) e costituito da piccoli placard di cellule carcinomatose disperse in abbondante stroma fibroelastosico (esito di teprapia neoadivuante).

2) Nel secondo campione, l'infiltrato stromale sul campione operatorio si presentava eterogeneo alternando aree con infiltrato infiammatorio di grado lieve ad aree hot-spot con infiltrato di grado moderato-severo.

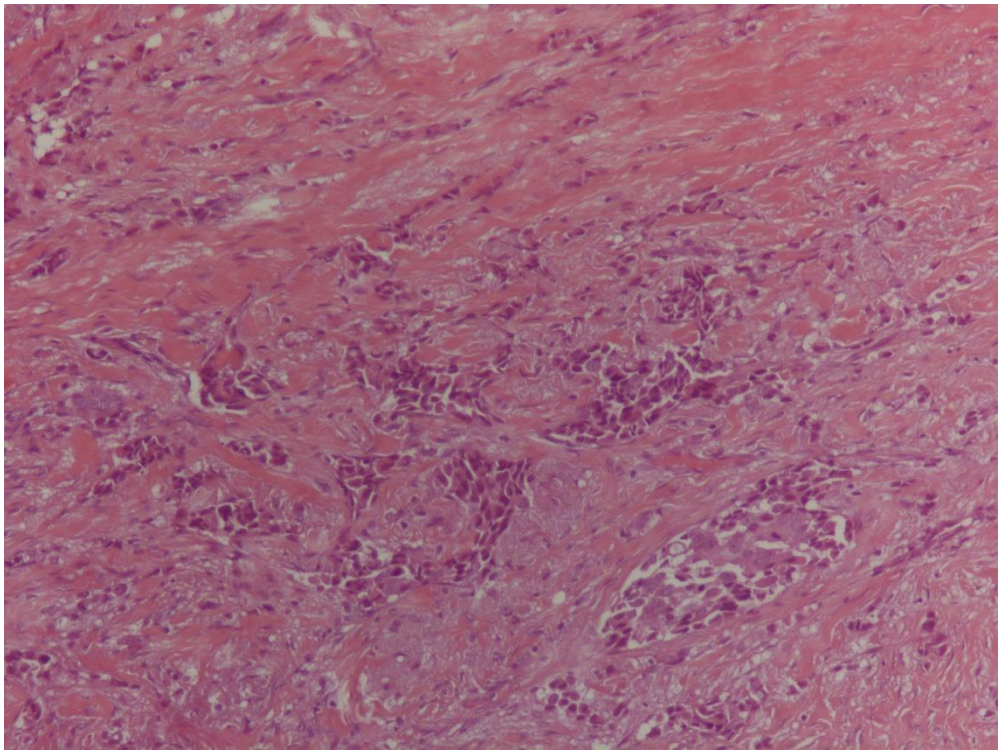
La valutazione media dell'infiltrato residuo comportava un declassamento alla categoria lieve (<20%). Nell'aree hot-spot la tipizzazione dell'infiltrato evidenziava comunque una popolazione CD3+ con rapporto CD4:CD8 = 1:5; CD20 assenti e CD138 assenti. L'infiltrato periferico e intraepiteliale risultano assenti.

Per i casi con infiltrato infiammatorio moderato su campione bioptico si è evidenziata:

1) In due casi l'infiltrato stromale è risultato notevolmente ridotto sebbene costituito prevalentemente da CD3. L'infiltrato periferico e intraepiteliale risultano assenti.

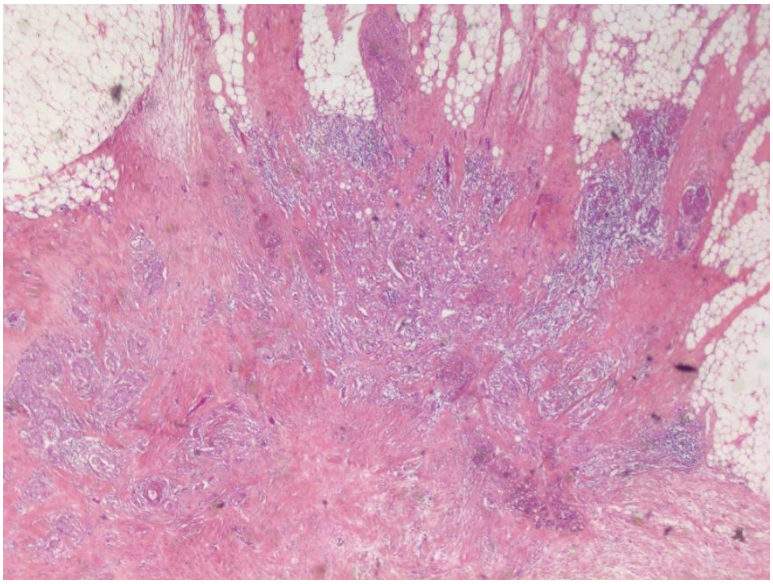


Campione bioptico con infiltrato moderato

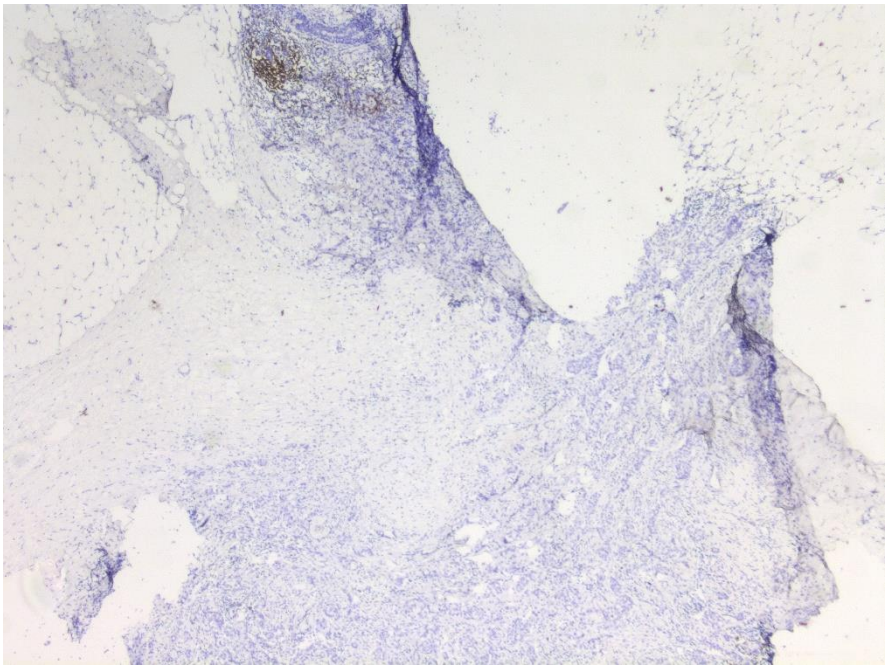


Residuo operatorio con scarso infiltrato

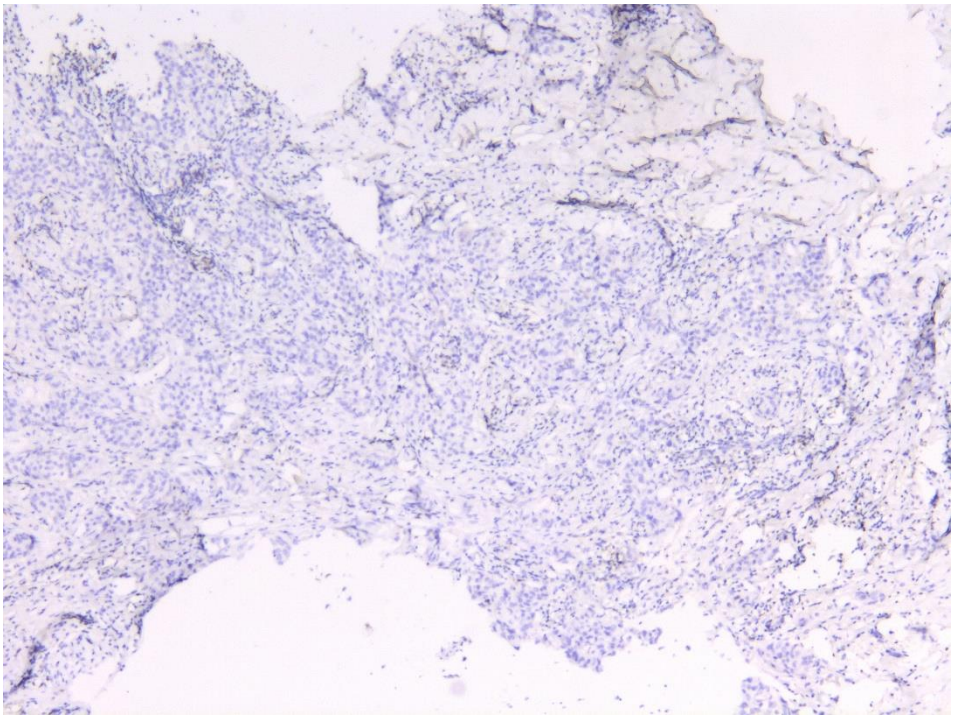
1) Nel terzo la quantità dell'infiltrato stromale è rimasta stabilmente di grado moderato (30%) con un residuo tumorale di dimensioni contenute. Era presente un infiltrato infiammatorio periferico a disposizione follicolare.



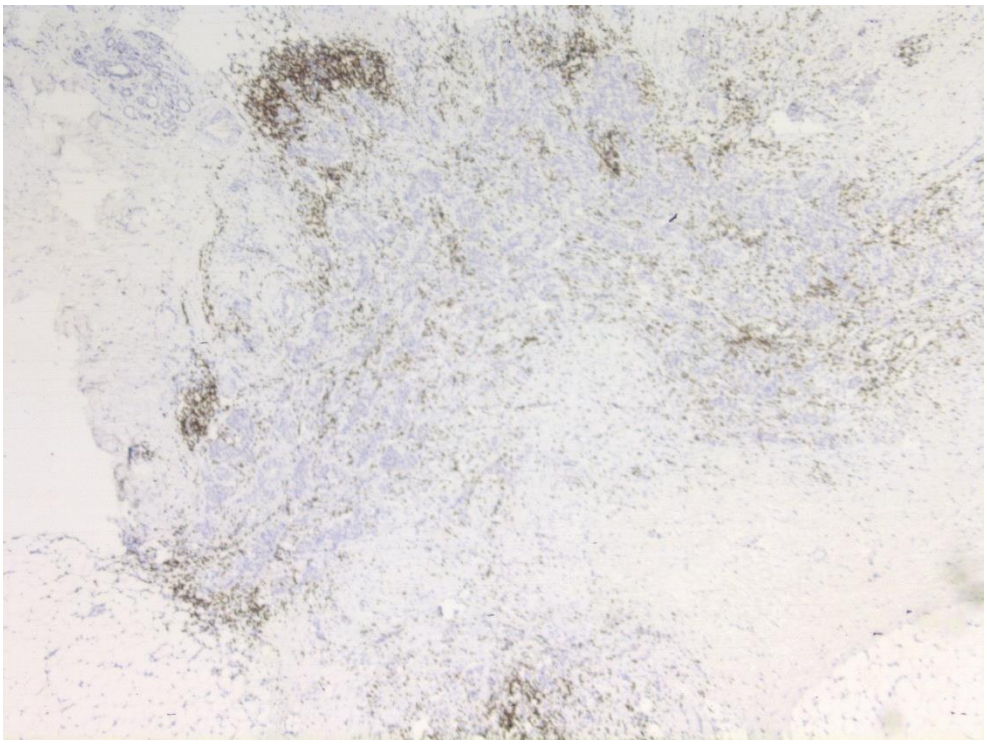
Campione con infiltrato ridotto



Disposizione follicolare CD20+



CD4 +



CD8+

Campione con risposta patologica completa (R0)

N°	ISTOTIPO	GRADO	SUBTIPO IMMUNO MOLECOLARE	MIB1	Ct	Cn	TILs STROMALI	TILs INTRAEPITELIALI	TILs PERIFERICI	NOTE	TERAPIA
1	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	HER2 OVEREXPRESSING, NON LUMINALE	≥20	≤ 2 cm	POS	MODERATO	ASSENTE	PRESENTE		HERCEPTIN
2	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	LUMINAL-B	≥20	>2 ≤ 5 cm	POS	SEVERO	ASSENTE	PRESENTE		CHT
3	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	HER2 OVEREXPRESSING, NON LUMINALE	≤14	>2 ≤ 5 cm	SCONOSCIUTO	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE		HERCEPTIN
4	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	HER2 OVEREXPRESSING, NON LUMINALE	≥20	>2 ≤ 5 cm	SCONOSCIUTO	SEVERO	PRESENTE	PRESENTE		HERCEPTIN
5	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	3	NULL	≥20	>2 ≤ 5 cm	SCONOSCIUTO	SEVERO	PRESENTE	ASSENTE		CHT
6	MEDULLARY-LIKE	2	NULL	≥20	≤ 2 cm	NEG	SEVERO	PRESENTE	PRESENTE		CHT
7	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	HER2 OVEREXPRESSING, NON LUMINALE	≥20	≤ 2 cm	POS	SEVERO	PRESENTE	PRESENTE		HERCEPTIN
8	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	3	NULL	≥20	≤ 2 cm	POS	SEVERO	PRESENTE	PRESENTE		CHT

N°	ISTOTIPO	GRADO	SUBTIPO IMMUNOMOLECOLARE	MIB1	Ct	Cn	TILs STROMALI	TILs INTRAEPITELIALI	TILs PERIFERICI	NOTE	TERAPIA
9	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	HER2 OVEREXPRESSING, NON LUMINALE	≥20	≤ 2 cm	SCONOSCIUTO	SEVERO	PRESENTE	PRESENTE		HERCEPTIN
10	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	LUMINAL-B	≥20	≤ 2 cm	SCONOSCIUTO	MODERATO	PRESENTE	PRESENTE		CHT
11	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	BASAL-LIKE	≥20	≤ 2 cm	POS	SEVERO	ASSENTE	PRESENTE		CHT
12	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	HER2 OVEREXPRESSING, NON LUMINALE	≥20	≤ 2 cm	SCONOSCIUTO	LIEVE	ASSENTE	ASSENTE		HERCEPTIN
13	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	3	HER2 OVEREXPRESSING, NON LUMINALE	≥20	>2 ≤ 5 cm	POS	MODERATO	PRESENTE	ASSENTE		HERCEPTIN
14	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	LUMINAL-B HER2 OVEREXPRESSING	≥20	> 5 cm	POS	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE		HERCEPTIN
15	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	HER2 OVEREXPRESSING, NON LUMINALE	≥20	>2 ≤ 5 cm	SCONOSCIUTO	MODERATO	ASSENTE	ASSENTE		HERCEPTIN
16	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	HER2 OVEREXPRESSING, NON LUMINALE	15-19	>2 ≤ 5 cm	POS	MODERATO	ASSENTE	ASSENTE		HERCEPTIN

N°	ISTOTIPO	GRADO	SUBTIPO IMMUNOMOLECOLARE	MIB1	Ct	Cn	TILs STROMALI	TILs INTRAEPITELIALI	TILs PERIFERICI	NOTE	TERAPIA
17	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	1	LUMINAL-B HER2 OVEREXPRESSING	≥20	>2 ≤ 5 cm	POS	LIEVE	ASSENTE	ASSENTE		HERCEPTIN
18	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	LUMINAL-B HER2 OVEREXPRESSING	15-19	>2 ≤ 5 cm	SCONOSCIUTO	MODERATO	PRESENTE	ASSENTE		HERCEPTIN
19	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	LUMINAL-B HER2 OVEREXPRESSING	≥20	>2 ≤ 5 cm	SCONOSCIUTO	MODERATO	PRESENTE	ASSENTE	CASO ETEROGENEO	HERCEPTIN
20	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	HER2 OVEREXPRESSING, NON LUMINALE	≤14	>2 ≤ 5 cm	NEG	SEVERO	ASSENTE	ASSENTE		HERCEPTIN
21	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	LUMINAL-B HER2 OVEREXPRESSING	≥20	>2 ≤ 5 cm	POS	LIEVE	ASSENTE	PRESENTE		HERCEPTIN
22	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	LUMINAL-B HER2 OVEREXPRESSING	≥20	>2 ≤ 5 cm	NEG	MODERATO	PRESENTE	ASSENTE		HERCEPTIN
23	MEDULLARY-LIKE	2	HER2 OVEREXPRESSING, NON LUMINALE	≥20	>2 ≤ 5 cm	SCONOSCIUTO	SEVERO	PRESENTE	PRESENTE		HERCEPTIN
24	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	LUMINAL-B HER2 OVEREXPRESSING	≥20	>2 ≤ 5 cm	NEG	LIEVE	ASSENTE	ASSENTE		HERCEPTIN
25	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	HER2 OVEREXPRESSING, NON LUMINALE	15-19	>2 ≤ 5 cm	POS	MODERATO	PRESENTE	ASSENTE		HERCEPTIN

Campione bioptico con risposta parziale (R1)

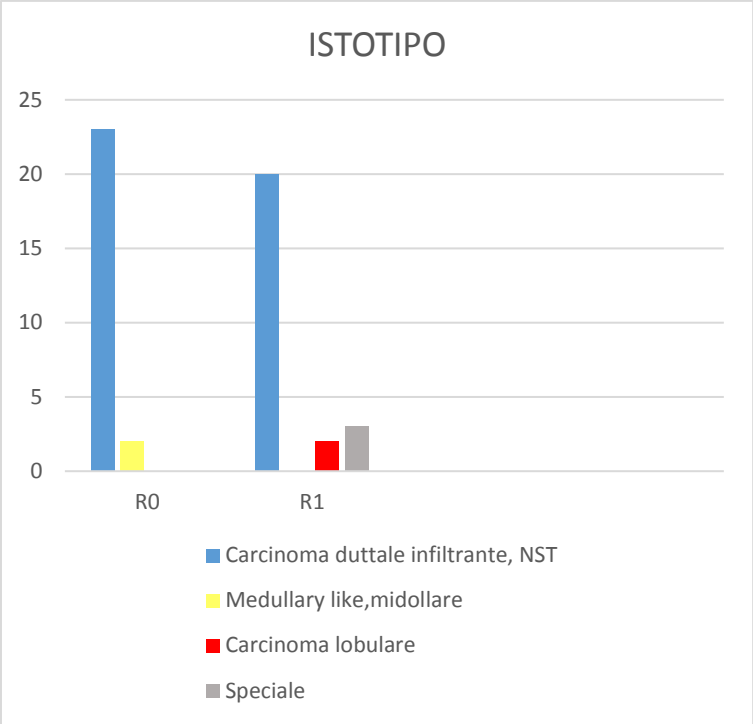
N°	ISTOTIPO	GRADE	SUBTIPO IMMUNO MOLECOLARE	MIB1	Ct	Cn	TERAPIA NEOADIUVANTE	TILs STROMALI	TILs INTRAEPITELIALI	TILs PERIFERICI
1	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	LUMINAL-B HER2 OVEREXPRESSING	≥20	>2 ≤ 5 cm	POS	HERCEPTIN CHT+FARMACO	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE
2	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	3	BASAL-LIKE	≥20	>2 ≤ 5 cm	POS	CHT	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE
3	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	LUMINAL-A	≤14	>2 ≤ 5 cm	SCONOSCIUTO	TERAPIA ORMONALE	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE
4	SPECIALE	2	LUMINAL-A	≤14	≤ 2 cm	POS	TERAPIA ORMONALE	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE
5	SPECIALE	2	LUMINAL-A	≤14	>2 ≤ 5 cm	SCONOSCIUTO	TERAPIA ORMONALE	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE
6	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	1	LUMINAL-A	≤14	≤ 2 cm	SCONOSCIUTO	TERAPIA ORMONALE	LIEVE	ASSENTE	ASSENTE
7	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	LUMINAL-B	≥20	>2 ≤ 5 cm	NEG	CHT	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE
8	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	1	LUMINAL-B	≥20	≤ 2 cm	SCONOSCIUTO	CHT	LIEVE	ASSENTE	ASSENTE

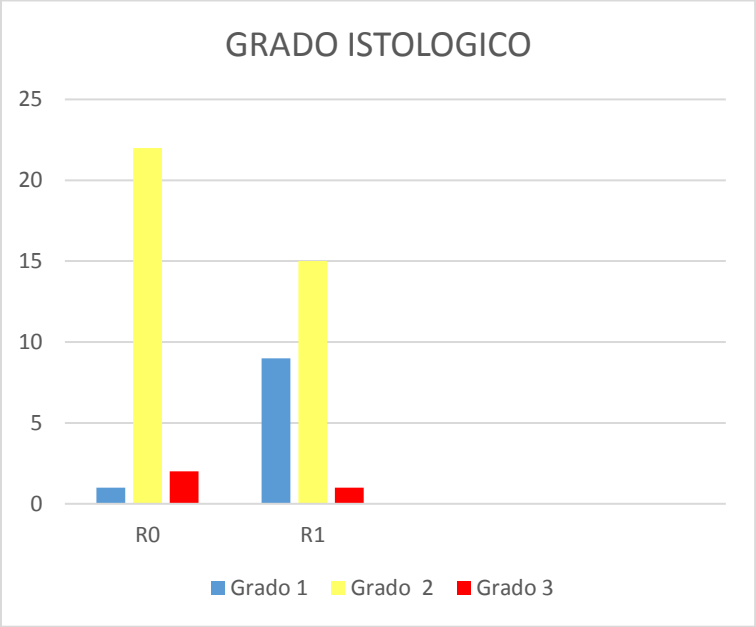
N°	ISTOTIPO	GRADO	SUBTIPO IMMUNOMOLECOLARE	MIB1	Ct	cN	TERAPIA NEOADIUVANTE	TILs STROMALI	TILs INTRAEPITELIALI	TILs PERIFERICI
9	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	1	LUMINAL-A	≤14	>2 ≤ 5 cm	SCONOSCIUTO	TERAPIA ORMONALE	LIEVE	ASSENTE	ASSENTE
10	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	BASAL-LIKE	≥20	>2 ≤ 5 cm	SCONOSCIUTO	CHT	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE
11	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	LUMINAL-B	≥20	>2 ≤ 5 cm	NEG	CHT	LIEVE	ASSENTE	ASSENTE
12	SPECIALE	2	LUMINAL-B HER2 OVEREXPRESSING	≤14	>2 ≤ 5 cm	NEG	HERCEPTIN CHT+FARMACO	MODERATO	ASSENTE	ASSENTE
13	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	LUMINAL-B	≥20	>2 ≤ 5 cm	NEG	CHT	SEVERO	PRESENTE	PRESENTE
14	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	LUMINAL-B	≥20	≤ 2 cm	SCONOSCIUTO	CHT	LIEVE	ASSENTE	ASSENTE
15	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	NULL	≥20	≤ 2 cm	SCONOSCIUTO	CHT	MODERATO	ASSENTE	ASSENTE
16	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	1	LUMINAL-B	≥20	≤ 2 cm	POS	CHT	SEVERO	PRESENTE	ASSENTE

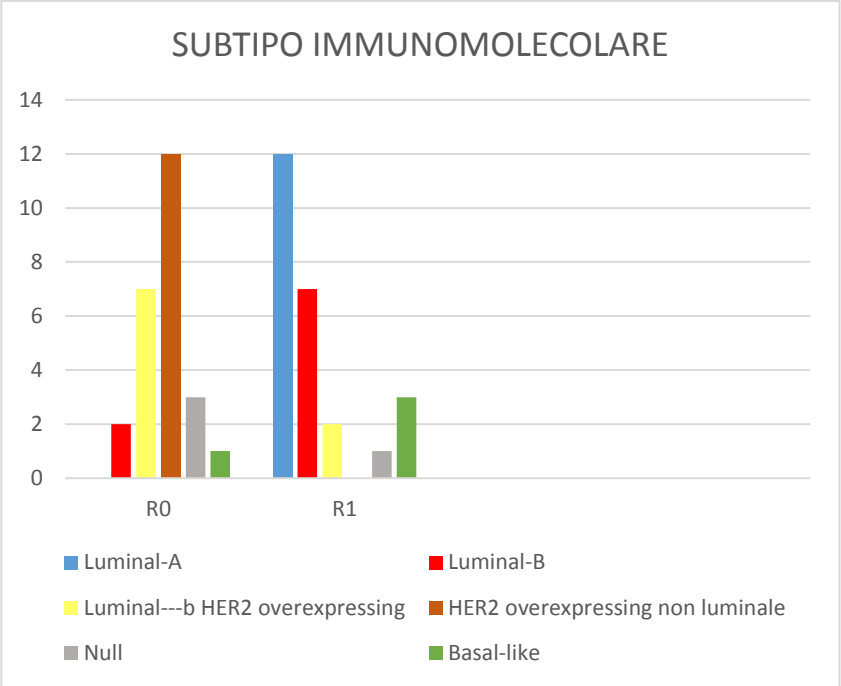
N°	ISTOTIPO	GRADO	SUBTIPO IMMUNOMOLECOLARE	MIB1	Ct	cN	TERAPIA NEOADIUVANTE	TILs STROMALI	TILs INTRAEPITELIALI	TILs PERIFERICI
17	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	1	LUMINAL-A	≤14	≤ 2 cm	SCONOSCIUTO	TERAPIA ORMONALE	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE
18	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	1	LUMINAL-A	≤14	>2 ≤ 5 cm	POS	TERAPIA ORMONALE	LIEVE	ASSENTE	ASSENTE
19	CARCINOMA LOBULARE INFILTRANTE	2	LUMINAL-A	≤14	> 5 cm	POS	TERAPIA ORMONALE	ASSENTE	ASSENTE	PRESENTE
20	SPECIALE	1	LUMINAL-A	≤14	>2 ≤ 5 cm	NEG	TERAPIA ORMONALE	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE
21	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	LUMINAL-A	15-19	>2 ≤ 5 cm	SCONOSCIUTO	CHT	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE
22	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	2	BASAL-LIKE	≤14	>2 ≤ 5 cm	SCONOSCIUTO	CHT	LIEVE	ASSENTE	ASSENTE
23	CARCINOMA LOBULARE INFILTRANTE	2	LUMINAL-A	≤14	> 5 cm	NEG	TERAPIA ORMONALE	LIEVE	ASSENTE	ASSENTE
24	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	1	LUMINAL-A	≤14	>2 ≤ 5 cm	POS	TERAPIA ORMONALE	MODERATO	ASSENTE	ASSENTE
25	CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	1	LUMINAL-B	≥20	>2 ≤ 5 cm	SCONOSCIUTO	CHT	ASSENTE	ASSENTE	ASSENTE

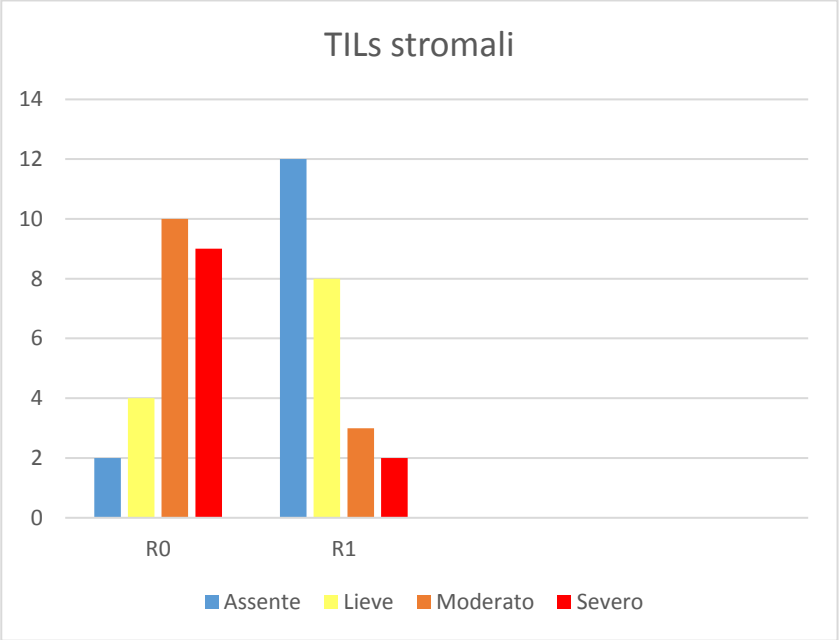
Campione chirurgico con risposta parziale (R1)

SCHEDA MAMMELLA	ISTOTIPO	GRADO	SUBTIPO IMMUNO MOLECOLARE	pT	pN
2014 / 510	CARCINOMA DUTTALE	2	LUMINAL-B HER2OVEREXPRESSING	2	3a
2014 / 504	CARCINOMA DUTTALE	3	BASAL-LIKE	1c	1a
2014 / 478	CARCINOMA DUTTALE	1	LUMINAL-A	1c	0
2014 / 467	SPECIALE	2	NULL	1b	1a
2014 / 461	SPECIALE	1	LUMINAL-A	1a	1a
2014 / 425	CARCINOMA DUTTALE	1	LUMINAL-A	1a	0
2014 / 415	CARCINOMA DUTTALE	1	LUMINAL-A	2	1a
2014 / 413	CARCINOMA DUTTALE	2	LUMINAL-A	1c	0
2014 / 406	CARCINOMA DUTTALE	1	LUMINAL-A	1c	X
2014 / 404	CARCINOMA DUTTALE	2	BASAL-LIKE	1c	0
2014 / 400	CARCINOMA DUTTALE	2	LUMINAL-A	1c	0
2014 / 388	SPECIALE	1	LUMINAL-B HER2OVEREXPRESSING	2	0
2014 / 387	CARCINOMA DUTTALE	2	LUMINAL-B	3	0
2014 / 385	CARCINOMA DUTTALE	2	LUMINAL-A	1c	0
2014 / 382	CARCINOMA DUTTALE	2	LUMINAL-A	1c	0
2014 / 374	CARCINOMA DUTTALE	1	LUMINAL-A	1a	2a
2014 / 371	CARCINOMA DUTTALE	2	LUMINAL-A	2	1a
2014 / 362	CARCINOMA DUTTALE	1	LUMINAL-A	1c	1a
2014 / 344	CARCINOMA LOBULARE	2	LUMINAL-A	3	3a
2014 / 341	SPECIALE	1	LUMINAL-A	1c	0
2014 / 321	CARCINOMA DUTTALE	2	LUMINAL-A	2	0
2014 / 313	CARCINOMA DUTTALE	2	NULL	2	2a
2014 / 292	CARCINOMA LOBULARE	2	LUMINAL-A	3	2a
2014 / 244	CARCINOMA DUTTALE	1	LUMINAL-A	1c	2a
2014 / 228	CARCINOMA DUTTALE	2	LUMINAL-A	2	1a


ISTOTIPO
25
20
15
10
5
0
R0
R1
Carcinoma duttale infiltrante, NST
Medullary like,midollare
Carcinoma lobulare
Speciale


GRADO ISTOLOGICO
25
20
15
10
5
0
R0
R1
Grado 1
Grado 2
Grado 3


SUBTIPO IMMUNOMOLECOLARE
14
12
10
8
6
4
2
0
R0
R1
Luminal-A
Luminal-B
Luminal---b HER2 overexpressing
HER2 overexpressing non luminale
Null
Basal-like


TILs stromali
14
12
10
8
6
4
2
0
R0
R1
Assente
Lieve
Moderato
Severo

CAPITOLO 6

Conclusioni

I campioni R0 che hanno mostrato una risposta patologica completa, si associano prevalentemente ad un infiltrato flogistico di grado moderato/severo, rimarcando il ruolo cruciale svolto dal sistema immunitario nella modulazione della risposta antitumorale. L'infiltrato mononucleato è costituito in maggioranza da linfociti T citotossici (CD8+), suggerendo una significativa associazione tra questo sottogruppo di cellule immunitarie e la risposta clinica. Occorre però precisare che questa categoria comprende carcinomi più frequentemente di alto grado e in prevalenza TN ed HER2+, sottotipi immunofenotipici di per sé più responsivi al trattamento neodiuvante. Nella categoria R1, al contrario, la presenza di residuo carcinomatoso, rilevata su campione chirurgico, potrebbe essere quindi imputabile alla lieve o del tutto assente infiltrazione del compartimento stromale da parte delle cellule immunitarie. A sostegno della nostra tesi, nei casi circoscritti (5) in cui è stato riscontrato un infiltrato moderato/severo, in 2 condizioni il residuo tumorale si presentava dimensionalmente contenuto, e costituito da piccoli aggregati di cellule carcinomatose disperse in abbondante stroma fibroelastosico. Tuttavia nella definizione di malattia residua si è tenuto conto dell'intera superficie indipendentemente dalla densità di

distribuzione cellulare. Nelle restanti situazioni l'infiltrato è risultato invece ridotto nel campione operatorio, come probabile conseguenza dell'eterogeneità del campione bioptizzato, rappresentativo di una piccola porzione del tumore, per cui nella valutazione media sarebbe stato ridimensionato. Nonostante la limitatezza del campione esaminato e la mancata discriminazione dei casi a seconda del grado istologico, terapia somministrata e subtipo immunomolecolare, appare comunque promettente il ruolo della densità TIL come fattore prognostico e predittivo di risposta alla terapia neoadiuvante. L'immunoterapia potrebbe inoltre rivoluzionare la cura dei carcinomi mammari più aggressivi e a prognosi peggiore, quali il TN o HER2+, da sola o in associazione con CHT; e con un opportuno potenziamento, essere applicata anche in quei contesti tumorali con un infiltrato assente o scarso. Tali risultati dovranno essere replicati su un numero più rilavante di pazienti, ma sono comunque concordi con le crescenti evidenze scientifiche che suggeriscono la rilevanza clinica di questo biomarcatore immunologico.

BIBLIOGRAFIA

- ***"Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer"*** *Maria VittoriaDieci[ab]NinaRadosevic-Robin[cd]SusanFineberg[ef]Gertvan den Eynden[gh]NilsTernes[ij]FrederiquePenault-Llorca[cdk]GiancarloPruneri[lm]TimothyM.D'Alfonso[n]SandraDemaria[o]CarlosCastaneda[p]JoselynSanchez[p]SunilBadve[q]StefanMichiels[ij]VeerleBossuyt[r]FedericoRojo[s]BaljitSingh[t]TorstenNielsen[u]GiuseppeViale[v]...RobertoSalgado[EF].*
- ***Linee Guida AIOM 2018***
- ***"Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study"*** *M. V. Dieci C. Criscitiello A. Goubar G. Viale P. Conte V. Guarneri G. Ficarra M. C. Mathieu S. Delaloge G. Curigliano F. Andre.*
- ***"The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014".***

  Salgado R1, Denkert C2, Demaria S3, Sirtaine N4, Klauschen F2, Pruneri G5, Wienert S2, Van den Eynden G6, et al.
- ***"Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer".*** *Denkert C, Loibl S, Noske A, et al. J Clin Oncol. 2010;28:105–113.*
- ***"Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment"****. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX.. Nat Immunol. 2013;14:1014–1022.*

- ***"Beyond immune density: critical role of spatial heterogeneity in estrogen receptor-negative breast cancer".*** *Sidra Nawaz, Andreas Heindl, Konrad Koelble & Yinyin Yuan.*
- ***"Long-Term Prognostic Risk After Neoadjuvant Chemotherapy Associated With Residual Cancer Burden and Breast Cancer Subtype".*** *W. Fraser Symmans, Caimiao Wei, Rebekah Gould, Xian Yu, Ya Zhang, Mei Liu, Andrew Walls, et al.*
- ***"Two progressive pathways of microinvasive carcinoma: low-grade luminal pathway and high-grade HER2 pathway based on high tumour-infiltrating lymphocytes"*** *M Morita, R Yamaguchi, M Tanaka, MT Gary et al.*
- ***"In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas****". Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, et al. Clin Cancer Res. 2014;20:2773–2782.*
- ***"Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer".*** *Yamaguchi R, Tanaka M, Yano A, et al. Hum Pathol. 2012;43(10):1688–1694.*

Ringraziamenti

Al termine di questo lavoro di tesi sperimentale è doveroso ringraziare coloro che ne hanno permesso la realizzazione, la Prof.ssa Anna La Teana, relatore interno, per la cortesia e disponibilità, il Prof. Domenico Angelucci, correlatore di questa tesi, per il supporto e le conoscenze messe a disposizione; la Dott.ssa Camilla Marinelli, per i confronti costruttivi, gli approfondimenti, gli spunti forniti alla mia tesi, oltre che per la disponibilità mai venuta meno per l'intero svolgimento di questa tesi.

Un grazie alla mia famiglia perché ho sempre potuto contare sulla loro fiducia, sul loro affetto, sul loro incrollabile supporto e soprattutto perchè senza di loro non avrei potuto raggiungere questo traguardo; al mio fidanzato Graziano che ha sopportato le mie incertezze, ma anche condiviso con me i tanti momenti di soddisfazione che hanno accompagnato questo percorso.

Agli amici di sempre che non hanno mai fatto mancare il loro sostegno.