



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

---

Corso di Laurea in Odontoiatria e Protesi Dentaria

**Espressione di PD-L1 come biomarcatore  
predittivo in pazienti con carcinoma  
ricorrente delle ghiandole salivari**

Relatore: Chiar.mo  
**Prof. Corrado Rubini**

Tesi di Laurea di:  
**Marco Pacetti**

A.A. 2023/2024

## **Indice**

### **Abstract**

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introduzione .....</b>                                                                              | <b>1</b>  |
| <b>2. Cenni anatomici e fisiologici delle ghiandole salivari .....</b>                                    | <b>2</b>  |
| <b>3. Eziologia delle neoplasie delle ghiandole salivari .....</b>                                        | <b>9</b>  |
| <b>4. Classificazione tumori della testa e del collo: ghiandole salivari (WHO 2022, 5th edition).....</b> | <b>10</b> |
| <b>5. Staging e grading delle neoplasie delle ghiandole salivari.....</b>                                 | <b>11</b> |
| <b>6. Istologia delle neoplasie maligne delle ghiandole salivari .....</b>                                | <b>14</b> |
| <b>6.1. Carcinoma mucoepidermoide. ....</b>                                                               | <b>14</b> |
| 6.2. Carcinoma a cellule aciniche.....                                                                    | 14        |
| 6.3. Carcinoma adenoideo-cistico .....                                                                    | 15        |
| 6.4. Adenocarcinoma NOS .....                                                                             | 16        |
| 6.5. Carcinoma dei dotti salivari.....                                                                    | 16        |
| 6.6 Carcinoma squamocellulare.....                                                                        | 17        |
| 6.7. Carcinoma mioepiteliale .....                                                                        | 17        |
| 6.8. Carcinoma ex adenoma pleomorfo .....                                                                 | 18        |
| <b>7. Ruolo dell'immunoterapia nelle neoplasie delle ghiandole salivari.....</b>                          | <b>19</b> |
| 7.1, Neoplasie e sistema immunitario .....                                                                | 19        |
| 7.2. PD-1/PD-L1 .....                                                                                     | 22        |
| 7.3. Immunoterapia .....                                                                                  | 24        |
| 7.4. Inibitori del checkpoint immunitario.....                                                            | 24        |
| 7.5. Pembrolizumab .....                                                                                  | 24        |
| 7.6. Anlotinib .....                                                                                      | 25        |
| <b>8. Materiali e metodi .....</b>                                                                        | <b>26</b> |
| 8.1. Immunoistochimica per PD-L1 22C3.....                                                                | 26        |
| 8.2. Colorazione.....                                                                                     | 26        |
| <b>9. Risultati .....</b>                                                                                 | <b>28</b> |
| <b>10. Discussione .....</b>                                                                              | <b>34</b> |
| <b>11. Conclusioni.....</b>                                                                               | <b>34</b> |
| <b>12. Bibliografia .....</b>                                                                             | <b>35</b> |
| <b>Ringraziamenti .....</b>                                                                               | <b>40</b> |

## **Abstract**

L'obiettivo del presente studio è stato valutare l'espressione di PD-L1 come biomarcatore predittivo in pazienti con carcinoma delle ghiandole salivari ponendo una particolare attenzione sulle recidive.

Materiali e metodi: lo studio comprende 32 casi di neoplasie maligne delle ghiandole salivari raccolte negli anni 2014-2024 dall'archivio dell'Istituto di Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche di Ancona. È stato effettuato l'esame immunoistochimico per PD-L1 22C3 al fine di valutare il Combined Positive Score (CPS) necessario per lo studio.

Risultati: l'espressione di PD-L1 è risultata evidente per la gran parte delle neoplasie ad alto grado e nelle recidive esaminate, con valori elevati in particolari istotipi come il carcinoma dei dotti salivari, mentre nella gran parte delle neoplasie esaminate di basso grado l'espressione di PD-L1 è risultata negativa. Si rende necessaria un aumento della casistica per avere una conferma ulteriore dei dati ottenuti.

Conclusioni: i dati dimostrano l'espressione di PD-L1 nei carcinomi di alto grado e nelle recidive. Questo risultato può permettere un nuovo approccio nel trattamento di queste patologie, in particolare quelle aggressive e/o recidivanti, basate su inibitori del checkpoint immunitario nei casi dove le terapie convenzionali risultano di scarsa efficacia.

## 1. Introduzione

I tumori delle ghiandole salivari rappresentano circa il 5% della totalità delle neoplasie della regione oro-facciale<sup>1</sup>. Il sito più frequentemente interessato è la ghiandola parotide (65,3%), seguito dalle ghiandole salivari minori (27,2%)<sup>2</sup>. La maggior parte delle neoplasie delle ghiandole salivari è di natura benigna, tra queste l'adenoma pleomorfo si presenta con maggior frequenza (66-71% dei tumori epiteliali benigni), seguita dal tumore di Warthin (22,8%)<sup>2-3</sup>.

Le neoplasie di natura maligna rappresentano dall'11 al 23,1% dei tumori delle ghiandole salivari<sup>4-5</sup>. Essi vengono distinti in forme a basso rischio e forme ad alto rischio, in base alle caratteristiche di aggressività locale, metastatizzazione linfonodale e capacità di invadere il nervo facciale con conseguente paralisi dello stesso.

I segni e sintomi di una lesione a carico delle ghiandole salivari maggiori possono variare da un quadro ostruttivo, infiammatorio, fino alla manifestazione di una massa sospetta clinicamente individuabile. Per quanto riguarda i segni e sintomi di una lesione delle ghiandole salivari minori, si possono avere quadri differenti a seconda del grado di invasività della neoplasia, dal rigonfiamento a causa di una massa sottomucosa fino al dolore e paralisi a seguito dell'invasione delle strutture adiacenti<sup>6</sup>.

Il recettore PD-1, è un comune elemento immunosoppressivo espresso sulla superficie dei linfociti T attivati e svolge un ruolo importante nella sottoregolazione del sistema immunitario in seguito al legame con i ligandi PD-L1 e PD-L2<sup>7</sup>.

In molti tumori, l'aumento dell'espressione di PD-1, causa una tolleranza immunitaria periferica, grazie alle capacità inibitorie che PD-1 esercita nei confronti dei linfociti T effettori, contribuendo alla sopravvivenza delle cellule tumorali<sup>7-8</sup>. Uno studio di 47 campioni di neoplasie maligne delle ghiandole salivari ha mostrato un'espressione di PD-L1 superiore al 51%, influenzando significativamente sullo stage, recidività e metastatizzazione dopo intervento chirurgico<sup>9</sup>.

## 2. Cenni anatomici e fisiologici delle ghiandole salivari

Le ghiandole salivari sono strutture esocrine responsabili della produzione e secrezione della saliva, un liquido fondamentale per la digestione, la protezione orale e la lubrificazione della cavità orale. Le ghiandole salivari si suddividono in due categorie: maggiori e minori.

La parotide, la sottomandibolare e la sottomandibolare sono ghiandole extramurali, pari e simmetriche, annesse alla bocca<sup>10</sup>. Esse sono denominate ghiandole salivari maggiori e sono responsabili per gran parte della produzione di saliva.

La saliva è un misto di secrezioni mucose e sierose. La funzione del muco è fondamentale per la lubrificazione delle pareti della cavità orale e dar consistenza al bolo alimentare. La componente sierosa della saliva, ricca di proteine enzimatiche (principalmente l'amilasi), opera una prima digestione dei polisaccaridi<sup>10-11</sup>(fig.1).

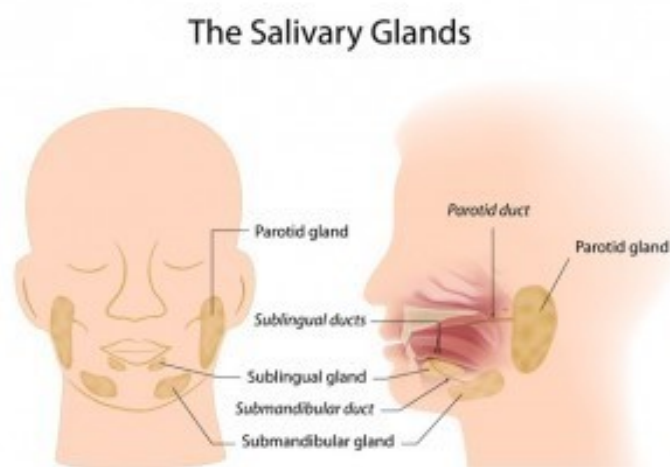


Figura 1. Ghiandole salivari maggiori.

La saliva contiene sostanze ad azione antibatterica, come lisozima e immunoglobuline di tipo IgA, che assicurano protezione locale, particolarmente nelle zone di ristagno di detriti alimentari (denti, giunzioni gengivodentali) sedi di maggior sviluppo di placca batterica. In tal senso si parla di funzioni detergenti della saliva<sup>11</sup>.

Le ghiandole salivari sono ghiandole di tipo tubulo-acinose ramificate; la complessa rete tubulare culmina nelle loro unità secretorie chiamate acini, i quali sono formati da una combinazione di cellule acinari a secrezione mucosa e sierosa<sup>12</sup>. I sistemi acinari e duttali sono associati a mioepitelio contrattile<sup>13</sup> (fig.2-3.).

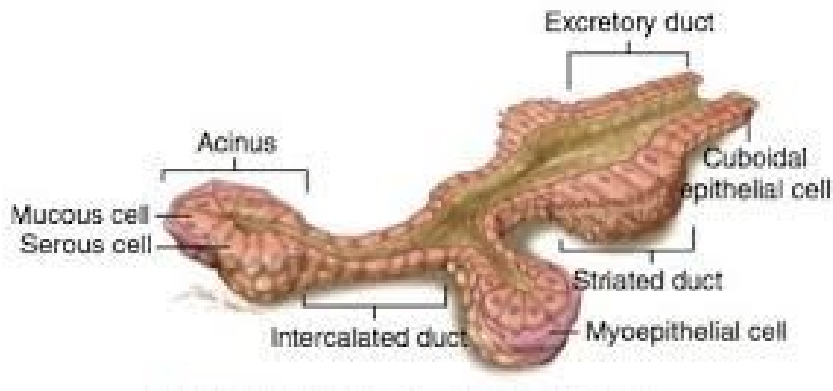


Figura 2. Sistema acinare.

La rete duttale è costituita da vari tipi di dotti che si susseguono ininterrottamente: dotti intercalati, dotti striati e dotti escretori (fig.2-3-4.). Il segmento immediatamente successivo alla struttura acinare prende il nome di dotto intercalato, il quale riceve la secrezione iniziale. Esso è rivestito da cellule epiteliali cubiche ed è associato ad altre cellule mioepiteliali. Dopo un breve tragitto il dotto assume il nome di dotto striato, aumentando il proprio calibro; le cellule di rivestimento sono di tipo colonnare. Al dotto striato fa seguito il dotto escretore dal quale la saliva viene espulsa nella cavità orale. Durante il tragitto avvengono cambiamenti elettrolitici con scambi ionici tra saliva e matrice extracellulare.

Le ghiandole salivari miste sono la sottomandibolare e la sottomandibolare, in esse possiamo trovare adenomeri costituiti da sole cellule sierose, sia adenomeri puramente mucosi e anche adenomeri misti. Questi ultimi presentano una forma caratteristica, con le cellule sierose che si dispongono intorno a quelle mucose, formando la cosiddetta semiluna del Giannuzzi<sup>12-14</sup>.

Le ghiandole salivari minori sono ghiandole esocrine di dimensioni ridotte, ma numerose, distribuite in vari punti della cavità orale. Sebbene non producano una quantità di saliva

paragonabile a quella delle ghiandole salivari maggiori, le ghiandole minori svolgono un ruolo importante nella lubrificazione, nella protezione delle mucose e nel mantenimento dell'igiene orale<sup>14</sup>.

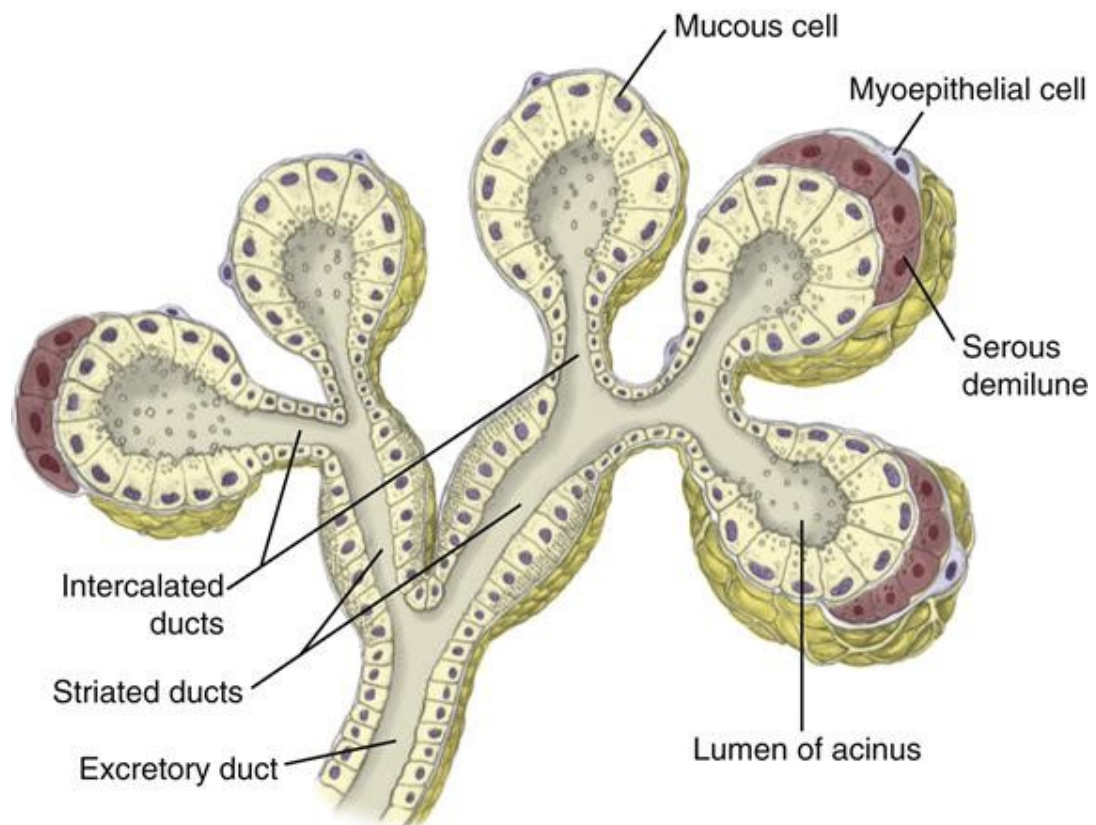


Figura 3. Schema della struttura istologica di adenomeri con rete tubulare.

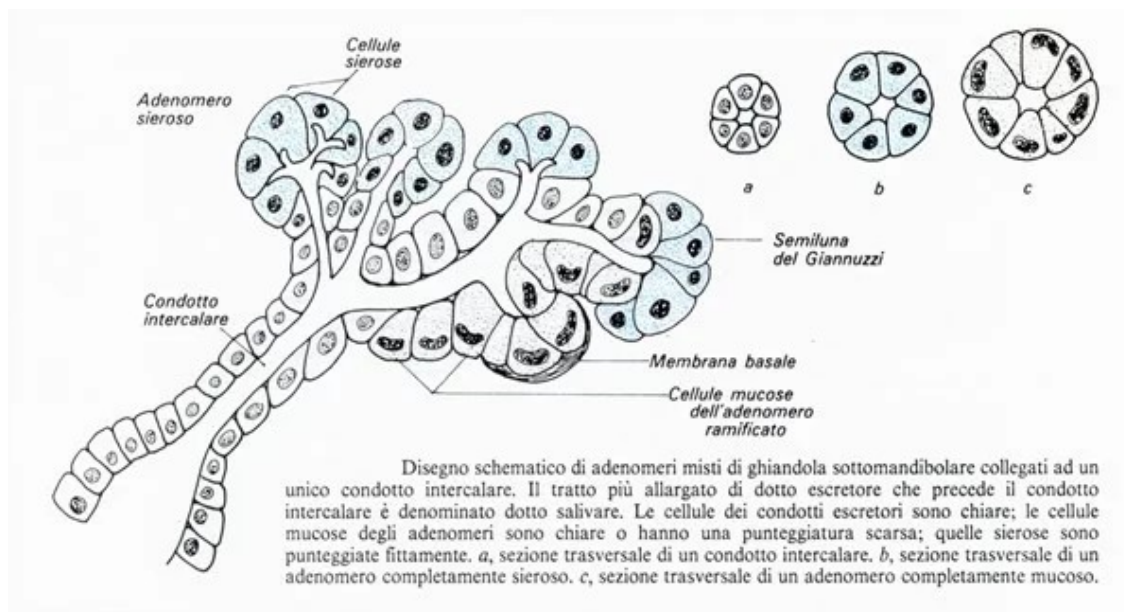


Figura 4. Disegno schematico di ghiandola sottomandibolare mista.

La parotide, pari, è la più voluminosa ghiandola salivare maggiore dal peso di circa 25-30g. Ciascuna ghiandola occupa la loggia parotidea che si estende, dal piano cutaneo, in profondità, fino nei pressi della faringe ed è avvolta dalla fascia parotidea<sup>15</sup>. Nella fascia parotidea si possono distinguere una parte superficiale, a diretto contatto con la superficie della ghiandola e con la cute, e una parte profonda che riveste invece le pareti della loggia e si trova a una certa distanza dalla superficie dell'organo, intorno al quale perciò si dispone un materiale connettivale ricco di grasso che si estende in profondità separando l'organo stesso.

La parotide si presenta, superficialmente e al taglio, lobulata e la si può descrivere considerandone una parte superficiale e una parte profonda.

La parte superficiale corrisponde alla faccia esterna della ghiandola e ha forma triangolare con la base in alto e l'apice in basso; è leggermente convessa ed è ricoperta dal foglietto superficiale della fascia parotidea. La parte profonda della parotide, meno aderente della superficiale alle pareti della loggia, ha una forma prismatica triangolare. Continua la parte superficiale e presenta una faccia anteriore, una posteriore e una superiore.

La sua vascolarizzazione è data arterie che provengono direttamente dalla carotide esterna, dall'auricolare posteriore (ramo della carotide esterna), dai rami auricolari anteriori della temporale superficiale, dalla trasversa della faccia e dal tratto iniziale della mascellare interna. Le vene sono tributarie della faciale anteriore e della giugulare esterna. L'innervazione sensitiva è assicurata dal nervo trigemino tramite il suo ramo auricolo-temporale, l'innervazione eccitosecretrice arriva da fibre parasimpatiche originate dal nucleo salivatorio inferiore (glossofaringeo) che vi giungono attraverso l'auricolo-temporale.

La parotide è costituita da acini esclusivamente sierosi che secernono una saliva ricca di amilasi, ptialina e sieromucine<sup>16</sup>. Il sistema tubulare sfocia nel dotto escretore, denominato dotto di Stenone, lungo circa 5 cm che attraversa il muscolo buccinatore e sbocca a livello della mucosa della guancia in corrispondenza del secondo molare superiore (fig.5-6).

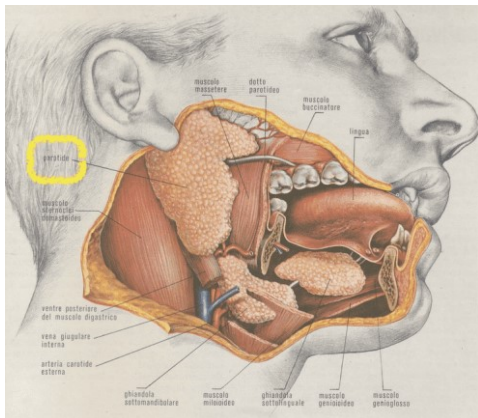


Figura 5. Ghiandola parotide e dotto parotideo (Stenone).

La ghiandola sottomandibolare, pari, è localizzata nella loggia sottomandibolare nella regione sopraioidea; dal peso di 7-8 g, è avvolta da una sottile capsula connettivale. La sottomandibolare la forma di un prisma triangolare in cui si distinguono una faccia laterale, una faccia media e una faccia inferiore. Dalla faccia mediale origina un prolungamento anteriore che si porta in avanti fino al contatto con la ghiandola sottolinguale.

La vascolarizzazione è data da arterie che provengono dall'arteria facciale e dal ramo sottomentale di quest'ultima. Le vene sono affluenti della sottomentale e della facciale anteriore<sup>17</sup>.

L'innervazione è data da fibre eccitosecretorie parasimpatiche che hanno origine dal nucleo salivatorio superiore e, attraverso il nervo facciale, la corda del timpano (dove decorrono insieme alle fibre gustative per i due terzi anteriori della lingua) e il nervo linguale, raggiungono il ganglio sottomandibolare posto alla superficie della ghiandola e annesso al margine inferiore del nervo linguale; da questo livello, fibre postgangliari vanno al parenchima ghiandolare. Le fibre ortosimpatiche raggiungono la ghiandola sottomandibolare a partire dal ganglio cervicale superiore, seguendo il plesso che si forma attorno all'arteria facciale.

La secrezione è mista, sieromucosa, tuttavia la componente sierosa è prevalente pertanto, si avranno territori della ghiandola composti esclusivamente da acini e sistemi tubulari del tutto simili a quelli descritti nella parotide. Accanto a questi sono presenti territori a secrezione mista. Il sistema tubulare culmina nel dotto sottomandibolare (di Wharton), che emerge dalla faccia mediale della ghiandola e sbocca nel solco sottolinguale, all'apice della caruncola sottolinguale.

La ghiandola sottolinguale, pari, dal peso di circa 3g, è la più piccola delle ghiandole salivari maggiori. Essa è situata nella loggia sottolinguale, immersa in tessuto connettivo lasso che si insinua all'interno della ghiandola stessa; possiamo distinguere una faccia laterale, una faccia mediale, due margini, superiore e inferiore, due poli, anteriore e posteriore.

La sua vascolarizzazione è data da rami delle arterie sottolinguale e sottomentale, mentre le vene afferiscono nella sottomentale e sottolinguale.

L'innervazione è del tutto simile a quella delle ghiandole sottomandibolari, con fibre eccitosecretorie (parasimpatiche) provenienti dal ganglio sottomandibolare, annesso al nervo linguale, o da un piccolo ganglio distinto, il ganglio sottolinguale.

La secrezione è mista, sieromucosa ma a prevalenza mucosa. La struttura della ghiandola sottolinguale è caratterizzata dalla prevalenza di tubuli mucosi chiusi all'estremità da

semilune sierose. Il sistema dei dotti escretori culmina nel dotto sottolinguale che sbocca sulla caruncola sottolinguale, a lato del dotto di Wharton (fig.6).

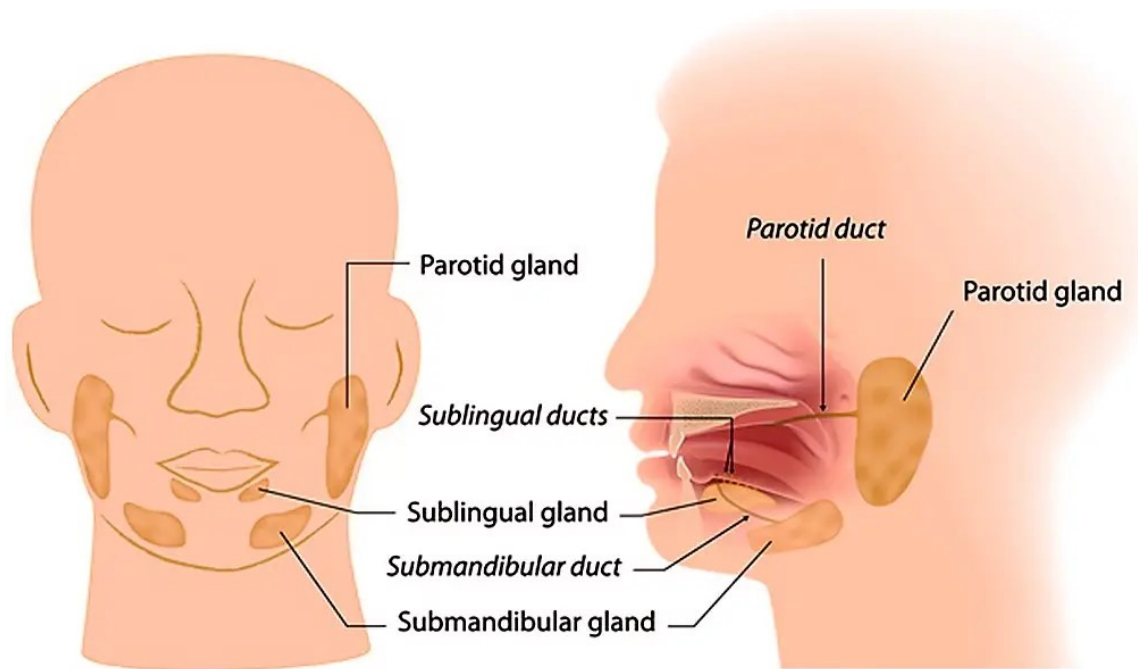


Figura 6. Rappresentazione delle ghiandole salivari maggiori con i rispettivi dotti.

Le ghiandole salivari minori, a differenza delle maggiori, non sono situate in delle regioni anatomiche specifiche ma si trovano disperse lungo il tratto aero-digestivo, con maggior concentrazione lungo la mucosa buccale, labiale, linguale, il palato e il pavimento della bocca. La loro secrezione è di tipo misto, sieromucosa, con prevalenza mucosa.

### **3. Eziologia delle neoplasie delle ghiandole salivari**

L'eziologia dei tumori delle ghiandole salivari risulta per la gran parte ancora sconosciuta.

Un fattore rilevante nell'incidenza di queste lesioni neoplastiche è risultato essere la dose di radiazioni ionizzanti, in grado di causare danni al materiale genetico cellulare. A differenza di altri tipi di tumore del cavo orale, il fumo e l'alcool non sembrano associati all'insorgenza di neoplasie delle ghiandole salivari<sup>18</sup>.

Sebbene ancora del tutto da chiarire, alcune specie virali (Citomegalovirus) sembrano giocare un ruolo nell'insorgenza di questi tumori<sup>19</sup>.

#### 4. Classificazione tumori della testa e del collo: ghiandole salivari (WHO 2022, 5th edition).

| <b>Benign Epithelial Tumours</b>                           | <b>Malignant Epithelial Tumours</b>           |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Pleomorphic adenoma                                        | Mucoepidermoid carcinoma                      |
| Basal cell adenoma                                         | Adenoid cystic carcinoma                      |
| Warthin tumour                                             | Acinic cell carcinoma                         |
| Oncocytoma                                                 | Secretory carcinoma                           |
| Salivary gland myoepithelioma                              | Microsecretory adenocarcinoma                 |
| Canalicular adenoma                                        | Polymorphous adenocarcinoma                   |
| Cystadenoma of salivary gland                              | Hyalinizing clear cell carcinoma              |
| Ductal papillomas                                          | Basal cell adenocarcinoma                     |
| Sialadenoma papilliferum                                   | Intraductal carcinoma                         |
| Lymphadenoma                                               | Salivary duct carcinoma                       |
| Sebaceous adenoma                                          | Myoepithelial carcinoma                       |
| Intercalated duct adenoma and hyperplasia                  | Epithelial-myoepithelial carcinoma            |
| Striated duct adenoma                                      | Mucinous adenocarcinoma                       |
| Sclerosing polycystic adenoma                              | Sclerosing microcystic adenocarcinoma         |
| Keratocystoma                                              | Carcinoma ex pleomorphic adenoma              |
|                                                            | Carcinosarcoma of the salivary glands         |
| <b>Mesenchymal tumours specific to the salivary glands</b> | Sebaceous adenocarcinoma                      |
| Sialolipoma                                                | Lymphoepithelial carcinoma                    |
|                                                            | Squamous cell carcinoma                       |
|                                                            | Sialoblastoma                                 |
|                                                            | Salivary carcinoma, NOS and emerging entities |

## 5. Staging e grading delle neoplasie delle ghiandole salivari

La classificazione TNM (AJCC 8th edition) è applicata solamente per i carcinomi delle ghiandole salivari maggiori. I tumori che insorgono nelle ghiandole salivari minori sono inclusi nella classificazione del loro sito di origine<sup>20</sup>.

T (Tumore): Rappresenta la dimensione e l'estensione del tumore primitivo.

TX: Tumore primitivo non definibile ma possibile presenza di cellule tumorali

T0: Tumore primitivo non evidenziabile.

T1: Tumore  $\leq 2$  cm, senza estensione extraparenchimale.

T2: Tumore  $> 2$  cm ma  $\leq 4$  cm, senza estensione extraparenchimale.

T3: Tumore  $> 4$  cm e/o con estensione extraparenchimale.

T4a: Tumore con invasione dei tessuti circostanti (nervo facciale, mandibola, condotto uditivo, pelle).

T4b: Tumore con invasione della base cranica o interessamento dell'arteria carotide.

pN (Linfonodi): Rappresenta l'impegno dei linfonodi regionali.

NX: Linfonodi regionali non valutabili.

N0: Assenza di metastasi nei linfonodi regionali.

N1: Metastasi nei linfonodi omolaterali,  $\leq 3$  linfonodi.

N2: Metastasi come di seguito specificato in N2a, N2b, N2c:

- N2a: Metastasi in un linfonodo omolaterale  $>3$  e  $\leq 6$  cm ENE (-).
- N2b: Metastasi nei linfonodi omolaterali, 2-6 linfonodi  $\leq 6$  cm ENE (-).
- N2c: Metastasi nei linfonodi controlaterali o bilaterali,  $\leq 6$  cm. ENE (-).

N3: Metastasi come di seguito specificato in N3a, N3b:

- N3a: Metastasi in un linfonodo con dimensione massima >6 cm ed ENE (-).
- N3b: Metastasi in un singolo linfonodo omolaterale con dimensioni massime >3 cm ed ENE (+) oppure Metastasi multiple omo-contro-bilaterali ed ENE (+).

Note aggiuntive: ENE (extranodal extention) è definito come l'estensione ed il superamento della capsula linfonodale da parte del tumore metastatico.

M (Metastasi): Indica la presenza di metastasi a distanza.

M0: Nessuna metastasi a distanza.

M1: Presenza di metastasi a distanza.

Nella classificazione degli stadi, le neoplasie maligne delle ghiandole salivari maggiori si suddividono generalmente in quattro stadi:

Stadio I: T1, N0, M0

Stadio II: T2, N0, M0

Stadio III: T3, N0, M0 oppure T1-3, N1, M0

Stadio IV:

IVA: T4a, qualsiasi N, M0 oppure T1-3, N2, M0

IVB: Qualsiasi T, N3, M0 oppure T4b, qualsiasi N, M0

IVC: M1 (metastasi a distanza)

Il grading delle neoplasie delle ghiandole salivari si basa sulla valutazione delle caratteristiche morfologiche di tipo citoarchitetturale. La classificazione viene utilizzata ai fini prognostici.

I principali parametri citologici per il grading del tumore delle ghiandole salivari:

- Differenziazione cellulare: un tumore ben differenziato, presenterà cellule simili a quelle presenti nel tessuto non neoplastico; un tumore scarsamente differenziato presenterà una popolazione cellulare con gradi elevati di atipia e displasia.

- Morfologia nucleare: Dimensione e forma del nucleo: nella neoplasia salivare, le cellule tumorali possono presentare nuclei ingranditi, irregolari e con un rapporto nucleo/citoplasma alterato.
- Ipercromasia: nuclei più scuri e densi indicano una maggiore attività mitotica e potenziale maligno.
- Distribuzione e organizzazione delle cellule: tumori meno differenziati tendono ad avere un'organizzazione cellulare disorganizzata, mentre tumori più ben differenziati mantengono una certa struttura e ordine.
- Mitosi: un numero elevato di mitosi (cellule in divisione) è un segno di un tumore più aggressivo.
- Necrosi: la presenza di aree di necrosi è tipica di tumori maligni ad alta aggressività.
- Invasione: il tumore può mostrare segni di invasione nei tessuti circostanti, un parametro che indica un potenziale maligno e di metastasi.

#### Sistemi di grading:

Un sistema di grading comune per i tumori delle ghiandole salivari è il sistema basato sui tumori maligni (adenocarcinomi, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoideo cistico, ecc.), che assegna un punteggio generalmente da tumore di basso grado (ben differenziato) a tumore di alto grado (poco differenziato)<sup>21</sup>.

Basso grado: ben differenziato, con una basso indice mitotico e segni di invasione minima.

Grado intermedio: caratterizzato da moderata attività mitotica e moderata displasia.

Alto grado: scarsa differenziazione cellulare, alto indice mitotico, necrosi e invasione significativa nei tessuti circostanti.

## **6. Istologia delle neoplasie maligne delle ghiandole salivari**

### **6.1. Carcinoma mucoepidermoide.**

Il carcinoma mucoepidermoide (MEC) è il tipo più comune di neoplasia maligna nelle ghiandole salivari, in particolare nella parotide, sebbene possa svilupparsi anche nelle ghiandole salivari minori e sottomandibolari. Ha un comportamento biologico variabile, da carcinoma a basso grado di malignità, ad alto grado di malignità<sup>22</sup>.

La distinzione tra i vari gradi di malignità è data principalmente dalla componente cellulare predominante che viene riscontrata a livello istologico; distinguiamo principalmente 3 gradi:

- Grado basso: componente cellulare ben differenziata a prevalenza di cellule mucose, bassa invasività locale.
- Grado intermedio: componente cellulare mista, non c'è predominanza di cellule mucose differenziate o cellule epidermoidali, presenza di atipia.
- Grado alto: tumore scarsamente differenziato con predominanza di cellule epidermoidali, alto grado di mitosi e maggiore invasività.

La diagnosi differenziale dei carcinomi mucoepidermoidi di basso grado comprendono l'adenoma pleomorfo, il tumore di Warthin, il mucocoele, l'adenoma policistico sclerosante e il carcinoma secretorio.

Studi recenti hanno messo in evidenza la corrispondenza tra l'espressione di PD-L1 e la comparsa di recidive, metastasi e il peggioramento della prognosi dei pazienti<sup>23</sup>.

### **6.2. Carcinoma a cellule aciniche**

Il carcinoma a cellule aciniche (ACC) è una rara neoplasia delle ghiandole salivari, colpisce principalmente la ghiandola parotide ma può insorgere anche nelle ghiandole salivari minori. Il tumore presenta una struttura solida e microcistica in cui la cellula acinica sierosa è la componente cellulare più comune. I tumori ad alto grado mostrano un pattern di crescita variabile o carcinoma scarsamente differenziato, con volume nucleare cellulare aumentato, pleomorfismo, necrosi ed attività mitotica aumentata oltre ad invasione linfovaskolare e perineurale.

Sebbene la trasformazione in alto grado di ACC sia relativamente bassa, essa è associata ad un'elevata espressione di PD-1 e PD-L1 nelle cellule immunitarie (IC) periferiche, aumentando la malignità e peggiorando la prognosi di questi casi<sup>24</sup>.

### **6.3. Carcinoma adenoideo-cistico**

Il carcinoma adenoideo-cistico (AdCC) è una neoplasia tipica dell'adulto-anziano, le ghiandole salivari maggiori sono il sito più comune di origine del carcinoma adenoideo cistico. La ghiandola parotide è la più frequentemente coinvolta, seguita dalla ghiandola sottomandibolare e dalle ghiandole salivari minori.

L'AdCC è un carcinoma invasivo, composto da cellule neoplastiche epiteliali e mioepiteliali con pattern tubulare, cribriforme e solido in associazione a matrice basofila.

Presenta due tipi cellulari principali: cellule duttali e cellule mioepiteliali. Le prime presentano citoplasma eosinofilo, mentre le seconde hanno un citoplasma chiaro.

Il pattern di crescita tubulare è composto da tubuli e dotti ben formati e rivestito da cellule mioepiteliali. Il pattern cribriforme (il più frequente) presenta cluster di cellule neoplastiche a struttura microcistica al cui interno è presente materiale mucoide. Il pattern solido è caratterizzato da cellule basaloidei con assenza di formazioni tubulari.

Un AdCC a componente solida statisticamente mostra un decorso più aggressivo. Recenti studi hanno dimostrato come il fattore di crescita dell'epidermide (EGF) legandosi al suo recettore gioca un ruolo determinante nell'invasività delle cellule tumorali maligne inducendo la transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) e l'espressione di PD-L1 eludendo in tal modo la risposta soppressiva immunitaria<sup>25</sup>.

L'AdCC con trasformazione ad alto grado, mostra una componente pleomorfa, con aumentato numero di mitosi; inoltre, la componente di alto grado è negativa per i marker mioepiteliali.

#### **6.4. Adenocarcinoma NOS**

L'adenocarcinoma NOS è caratterizzato da una proliferazione di cellule epiteliali maligne che formano ghiandole o strutture simili a dotti, ma senza una chiara specificazione del sottotipo istologico. Poiché non è possibile determinare un tipo preciso, il termine "NOS" viene usato per descrivere tumori con caratteristiche non completamente definite, che non rientrano in nessuno dei precedenti istotipi.

Le strutture duttali sono predominanti nei tumori di basso grado, meno frequenti nei tumori ad alto grado, in questi ultimi è evidente il ruolo che svolge l'inibizione del checkpoint immunologico aumentandone la malignità<sup>26</sup>.

La presenza di componente duttale in questo tipo di neoplasie suggerisce l'origine salivare.

#### **6.5. Carcinoma dei dotti salivari**

Il carcinoma dei dotti salivari (SDC) è un tumore aggressivo con prognosi estremamente sfavorevole e sopravvivenza a 5 anni inferiore al 50%. Può insorgere de novo o svilupparsi da carcinoma ex adenoma pleomorfo; la presenza di un nodulo ialinizzato suggerisce quest'ultima origine.

Il tumore ha una notevole somiglianza con il carcinoma duttale della mammella sia per quanto riguarda la sua struttura che aggressività, con alta percentuale di invasioni perineurali e linfo-vascolari.

Mutazioni a carico del DNA, sistema MHC I difettoso e la eccessiva espressione di PD-L1 sono responsabili dell'aggressività e invasività, con la presenza di recidive in circa il 40% dei casi e metastasi linfonodali e a distanza in circa il 50% dei casi<sup>27</sup>.

Il carcinoma del dotto salivare mostra strutture complesse, spesso disposte in nidi solidi cribriformi e formazioni cistiche; in molti casi sono presenti zone necrotiche.

Le cellule tendono ad essere di grandi dimensioni in maniera non omogenea con notevoli variazioni di forma. Il citoplasma è eosinofilo con la presenza di nucleoli.

## **6.6 Carcinoma squamocellulare**

Il carcinoma squamocellulare dei dotti salivari è un tipo raro di tumore, quasi esclusivamente localizzato a livello parotideo. Solitamente il carcinoma squamocellulare si sviluppa a livello della cute del testa-collo e del cavo orale e la localizzazione a livello delle ghiandole salivari, nella gran parte dei casi, rappresenta una metastasi del tumore primitivo nei linfonodi parotidei.

Nel contesto delle ghiandole salivari, il carcinoma squamocellulare può verificarsi come una metaplasia squamosa all'interno dei dotti salivari, in cui le cellule epiteliali normali si trasformano in cellule squamose, a causa di un processo patologico.

Si presenta solitamente come una massa di consistenza dura con infiltrazione delle strutture circostanti. La diagnosi differenziale si pone con il carcinoma mucoepidermoide di alto grado.

## **6.7. Carcinoma mioepiteliale**

Il carcinoma mioepiteliale è un tumore raro che origina dalle cellule mioepiteliali delle ghiandole salivari, ma può anche svilupparsi in altri tessuti ghiandolari, come le ghiandole sudoripare o la mammella. Le cellule mioepiteliali sono cellule specializzate che si trovano tra le cellule epiteliali e la membrana basale nelle ghiandole e hanno il compito di contrarsi permettendo di espellere il secreto dalle ghiandole.

A livello microscopico, questo tumore può presentare una grande variabilità, con tessuti che mostrano segni di malignità<sup>28</sup>. Il carcinoma mioepiteliale è composto principalmente da cellule mioepiteliali atipiche che si sviluppano da quelle che normalmente si trovano tra le cellule epiteliali e la membrana basale delle ghiandole. Queste cellule a seconda della struttura sono: cellule fusate, cellule ovali e cellule epitelioidi.

Il carcinoma mioepiteliale può avere una struttura solida, trabecolare o tubulo-acinare. Questi tumori possono essere disorganizzati e invasivi, invadendo i tessuti circostanti come tessuti muscolari o strutture nervose: il coinvolgimento del VII nervo cranico può causare una emiparesi facciale. La loro struttura è solitamente molto indistinta, e in molti casi manca di una chiara organizzazione. Tuttavia, in alcuni casi, è possibile osservare una certa organizzazione nelle cellule tumorali, che formano piccoli tubi o acini, talvolta

sono osservabili formazioni di pseudocisti ed aree di necrosi; quest'ultima caratteristica è propria dei tumori aventi maggiore aggressività.

#### **6.8. Carcinoma ex adenoma pleomorfo**

Il carcinoma ex adenoma pleomorfo (PA) è un tipo raro di tumore maligno delle ghiandole salivari, che rappresenta dal 5 al 15% di tutti i tumori maligni delle ghiandole salivari e si stima che si sviluppi nel 6% di tutti i PA.

Per porre diagnosi di carcinoma ex adenoma pleomorfo è necessario che nel campione chirurgico sia presente PA residuo.

È classificato come non invasivo, minimamente invasivo e invasivo, in base al grado di infiltrazione, attraverso la capsula e nei tessuti circostanti. Questo tumore può essere puramente epiteliale o mioepiteliale, con infiltrazione del tessuto ghiandolare e perighiandolare. La capacità di dare metastasi a distanza nei casi di tumore invasivo è molto elevata fino ad arrivare ad oltre il 65%.

I tumori di origine mioepiteliale hanno mostrato mutazioni del gene TERT e sovraespressione di PD-L1 e PD-L2 nel 51% dei casi, questi tumori hanno mostrato un'aggressività elevata e peggioramento della prognosi<sup>29</sup>.

Risultati più favorevoli sono stati osservati per i tumori intracapsulari e minimamente invasivi, i quali, presentano tassi di recidiva e metastasi regionali molto bassi.

## **7. Ruolo dell'immunoterapia nelle neoplasie delle ghiandole salivari**

### **7.1, Neoplasie e sistema immunitario**

La prima fase nello sviluppo del tumore è l'iniziazione, durante la quale un'alterazione del materiale genetico della cellula (mutazione) stimola la cellula a trasformarsi in cancerosa. L'alterazione del materiale genetico della cellula può verificarsi spontaneamente come evento casuale o essere causata da un'esposizione esterna a una sostanza che provoca il tumore (cancerogena). Queste mutazioni rendono le cellule cancerose geneticamente e fenotipicamente diverse dalle cellule normali fino a determinare un cambiamento strutturale delle proteine espresse rendendole immunogeniche<sup>30</sup>. Per tali motivi le cellule tumorali dovrebbero apparire come “non-self” al sistema immunitario e quindi attivare una sua risposta promuovendo la distruzione delle cellule mutate.

Tuttavia, l'eliminazione delle iniziali cellule cancerose non è sempre attuabile per una serie di fattori, se il sistema immunitario non è capace di eliminare totalmente le cellule mutate si arriverà ad una fase di equilibrio in cui il tumore è presente ma non rilevabile, fino ad arrivare all'evasione dal sistema immunitario che porta alla progressione della patologia.

Questi processi sono descritti nel fenomeno chiamato “immunoediting”, che appunto è costituito da tre fasi: eliminazione, equilibrio ed evasione<sup>31</sup>.

I primi elementi del sistema immunitario ad essere attivati sono le cellule NK, le quali riconoscendo un clone di cellule maligne come estranee ne causano la distruzione. Questo processo porta alla liberazione di antigeni tumorali, i quali vengono assorbiti da macrofagi e cellule dendritiche all'interno dei linfonodi. A questo livello vengono prodotte citochine e gli antigeni tumorali vengono presentati in congiunzione con le molecole MHC di classe I. Questo meccanismo permette l'espansione clonale di cellule T e B antigene-specifiche e prende il nome di immunità adattiva. Contemporaneamente le citochine prodotte promuovono il sistema immunitario innato ed insieme portano alla completa eliminazione del clone maligno ed allo sviluppo di una memoria immunologica specifica per gli antigeni associati al tumore stesso.

Tutto questo è possibile in un organismo con un sistema immunitario altamente competente e l'immunogenicità del tumore è elevata<sup>35</sup>.

Nel caso in cui l'immunocompetenza dell'ospite e/o l'immunogenicità del tumore diminuiscano, le cellule cancerose possono evadere in parte la loro eliminazione ma rimanendo confinate in uno stato di equilibrio senza progressione della malattia e senza segni clinici evidenti.

Un'ulteriore perdita di immunogenicità delle cellule persistenti o una perdita di competenza immunitaria importante permette al tumore l'evasione dal sistema di immunosorveglianza ed una sua progressione.

Le cellule T regolatorie (Treg) sono un gruppo fenotipicamente e funzionalmente eterogeneo di linfociti T. Le Treg sono presenti in molte forme, comprese le cellule T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e sono differenziate principalmente dall'espressione di marcatori specifici. Ad esempio, le Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> contribuiscono attivamente al mantenimento dell'omeostasi immunitaria e dell'autotolleranza immunologica. I treg si trovano nel sangue periferico, in vari tessuti e nelle regioni infiammatorie, incluso il microambiente tumorale eterogeneo (TME) con altre cellule immunosoppressive e immunostimolanti. Come altri linfociti T, le Treg esprimono numerosi recettori che svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della risposta immunitaria<sup>33</sup>. Alcuni di questi recettori, inclusi CTLA-4, GITR e PD-1, sono espressi sulle Treg (Fig. 7). L'elevata espressione di alcuni recettori da parte delle Treg e dei tessuti tumorali contribuisce all'evasione immunitaria del tumore.

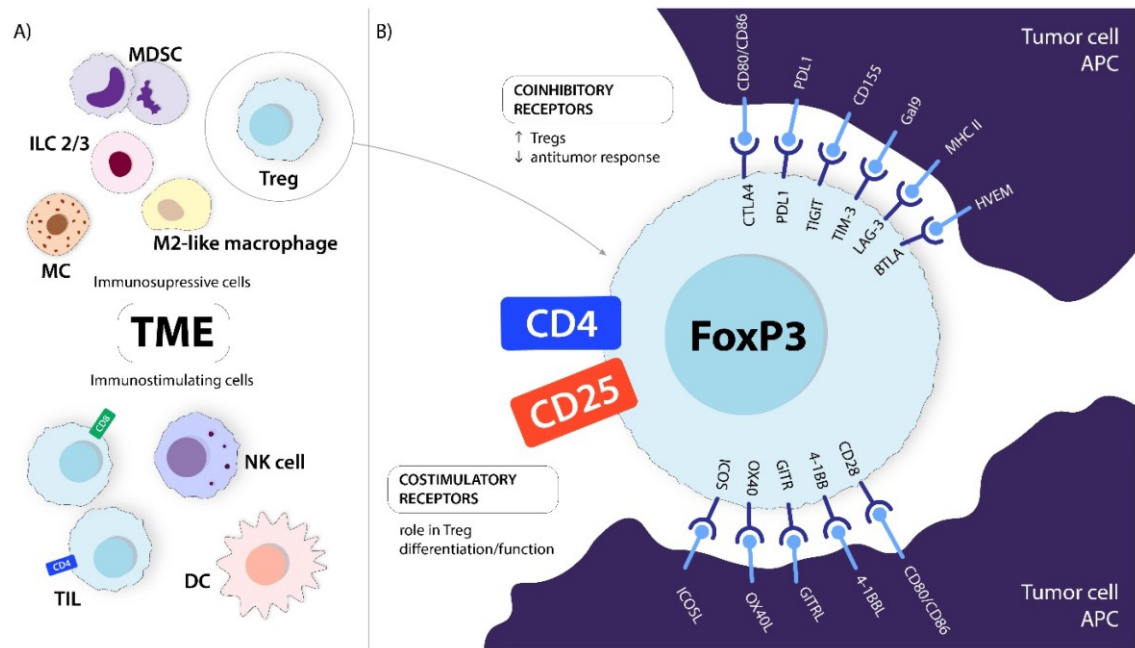


Figura 7. (A) Cellule immunosoppressive e immunostimolanti nel TME. (B) Recettori stimolatori e inibitori espressi dalle Treg.

## **7.2. PD-1/PD-L1**

La via PD-1/PD-L1 controlla l'induzione e il mantenimento della tolleranza immunitaria all'interno del microambiente tumorale. L'attività di PD-1 e dei suoi ligandi PD-L1 o PD-L2 sono responsabili dell'attivazione, della proliferazione e della secrezione citotossica delle cellule T nel cancro, ma anche della degenerazione antitumorale del sistema immunitario.

PD-1 è una proteina di 288 aminoacidi costituita da un dominio IgV N-terminale, un dominio transmembrana, una coda citoplasmatica con due modelli di segnalazione basati sulla tirosina e una catena laterale di 20 aminoacidi che separa il dominio IgV dal dominio plasmatico. PD-1 recluta il dominio SH2/SHP3 contenente proteine con una sequenza di aminoacidi (VDYGEL) nel dominio N-terminale e una sequenza (TEYATI) nel dominio C-terminale<sup>34</sup>. Entrambe le sequenze formano un motivo di commutazione immunorecettiva (ITSM) basato sulla tirosina che è essenziale per la funzione inibitoria di PD-1. I ligandi di PD-1 (PD-L1 e PD-L2) sono entrambi glicoproteine transmembrana di tipo 1 contenenti domini IgC e IgV. Condividono un'identità di aminoacidi del 40%, mentre PD-L1/PD-L2 condividono una somiglianza del 20% con altri omologhi di B7.

Il Programmed Death Ligand 1 (PD-L1; indicato anche come CD279 e B7-H1), appartiene alla serie B7 ed è una glicoproteina transmembrana di tipo 1 da 33 kDa che contiene 290 aminoacidi con domini Ig e IgC nella sua regione extracellulare<sup>35</sup>. Contrariamente al PD-L2 che è espresso esclusivamente nelle cellule presentanti l'antigene (APC), PD-L1 può essere espresso anche nei linfociti T, macrofagi, Linfociti B e cellule epiteliali, soprattutto in eventi infiammatori.

I linfociti T umani CD4+ e CD8+ non mostrano espressione di PD-L1 e PD-L2 se non stimolati. Una volta attivate sia CD4+ che CD8+, PD-L1 viene indotto, mentre PD-L2 presenta un'espressione molto bassa in seguito a stimolazione dei linfociti CD8+ ma non in linfociti CD4+.

Durante l'attivazione delle cellule T, vi è la costimolazione CD3/CD28 che induce numerosi segnali intracellulari, tra cui l'attivazione del phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) che promuove l'attivazione della proteinkinase B (Akt). Un livello elevato PD-L1 è accompagnato dalla fosforilazione della via PI3K/Akt nelle cellule resistenti<sup>36</sup>. Inoltre,

il livello della proteina PD-L1 risulta diminuito da un inibitore di Akt, suggerendo che la segnalazione PI3K/Akt media l'espressione di PD-L1.

Tuttavia, anche il PD-L1 può regolare la via della Pi3K/Akt; sia la porzione transmembrana che quella intracellulare della via PD-1/PD-L1 partecipano a questo processo<sup>37</sup>.

Le reazioni possono verificarsi sia nelle cellule immunitarie che nelle cellule tumorali. PD-L1 attiva la via PI3K/Akt stabilizzando la  $\beta$ -catenina e la sovraespressione di PD-L1 aumenta anche l'espressione di p-Akt. Recenti studi confermano che l'asse PD-1/PD-L1 può sovraregolare la fosforilazione di Akt, inoltre il PD-L1 intrinseco cellulare si lega preferenzialmente ad Akt rispetto ad altre proteine segnale PI3K/Akt (Fig. 8).

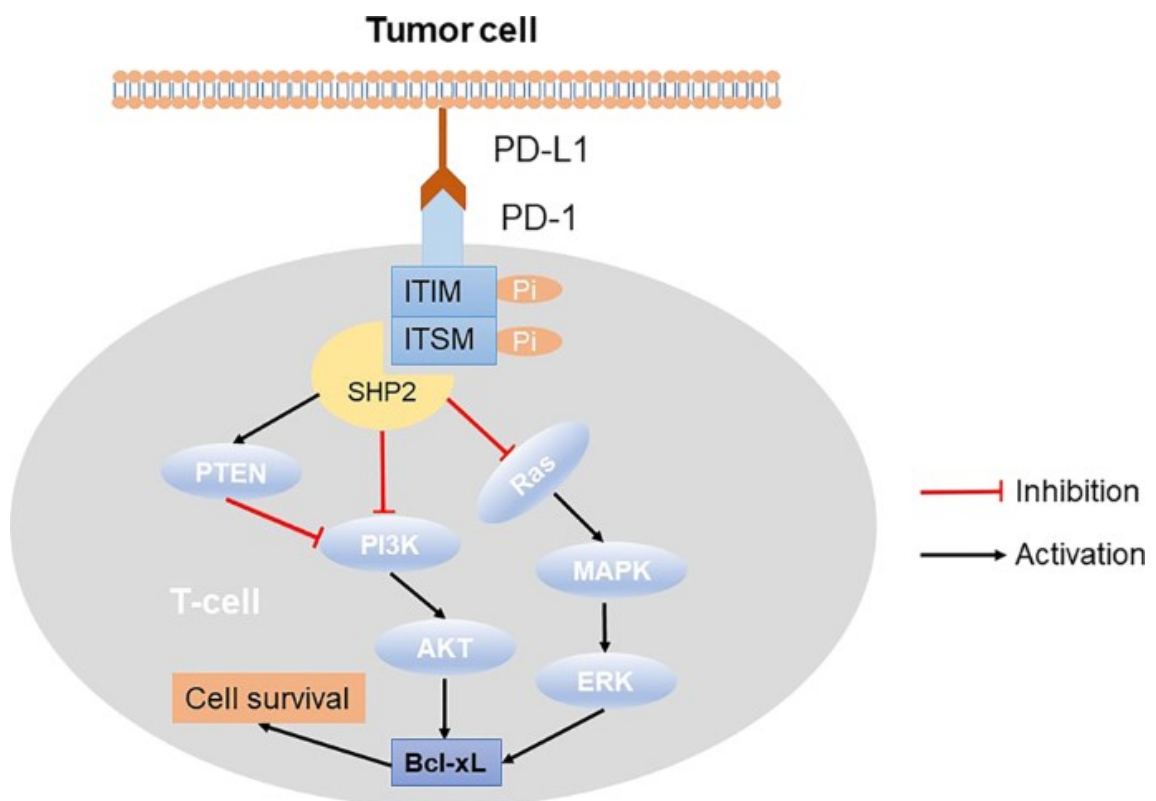


Figura 8. Regolazione di PI3K/Akt tramite PD-L1.

### **7.3. Immunoterapia**

L'immunoterapia contro le neoplasie è un tipo di trattamento medico che sfrutta il sistema immunitario del corpo per curare il cancro. Invece di utilizzare sostanze esterne come la chemioterapia o la radioterapia, l'immunoterapia stimola o potenzia le difese naturali dell'organismo per riconoscere e distruggere le cellule tumorali. Tra i sistemi di immunoterapia più studiati ed utilizzati si segnalano vaccini antitumorali con antigeni tumorali, l'utilizzo di citochine come IL-2 e interferone gamma (IFN- $\gamma$ ), anticorpi monoclonali e inibitori del checkpoint immunitario.

### **7.4. Inibitori del checkpoint immunitario**

Gli inibitori del checkpoint immunitario sono farmaci che agiscono sul sistema immunitario, bloccando le proteine che limitano la sua capacità di attaccare le cellule tumorali. Come illustrato precedentemente, i checkpoint immunitari sono meccanismi naturali che servono a prevenire risposte immunitarie eccessive e dannose. Tuttavia, i tumori possono sfruttare questi stessi meccanismi per eludere il sistema immunitario, impedendogli di identificare e distruggere le cellule tumorali. Gli inibitori del checkpoint immunitario attualmente sviluppato comprendono gli inibitori del PD-1, del PD-L1 e di CTLA-4<sup>38</sup>.

### **7.5. Pembrolizumab**

Il pembrolizumab è una sostanza che appartiene alla classe di farmaci antitumorali che prendono il nome di anticorpi monoclonali, nello specifico, è un anticorpo monoclonale umanizzato (isotipo IgG4/kappa con un'alterazione stabilizzante di sequenza nella regione Fc) anti PD-1.

Pembrolizumab si lega al recettore PD-1 presente sulla superficie delle cellule T del sistema immunitario impedendone il legame con il PD-L1 presente sulle cellule tumorali, permettendo al sistema immunitario di attivarsi, identificare e distruggere le cellule tumorali<sup>39-40</sup>.

### **7.6. Anlotinib**

Anlotinib è un nuovo inibitore della tirosina chinasi somministrato per via orale che ha come target il recettore del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGFR), il recettore del fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR), i recettori del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR) e c-kit.

Anlotinib ha dimostrato una notevole efficacia soprattutto del trattamento dei tumori della testa e del collo (HNC) sia come monoterapia, sia in associazione con inibitori del checkpoint immunitario (pembrolizumab)<sup>36-41</sup>.

## **8. Materiali e metodi**

Lo studio comprende 32 casi di neoplasie maligne delle ghiandole salivari raccolte negli anni 2014-2024 dall'archivio dell'Istituto di Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche di Ancona. Il range di età dei soggetti osservati è compreso tra i 30 e 87 anni con un'età media di 59 anni. I casi sono stati diagnosticati tramite esame istologico e rivalutati dal Prof. Corrado Rubini.

### **8.1. Immunoistochimica per PD-L1 22C3**

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx è un saggio immunoistochimico qualitativo che utilizza Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, destinato all'uso nella rilevazione della proteina PD-L1 in un tessuto fissato in formalina, incluso in paraffina (FFPE). L'espressione della proteina PD-L1 è determinata utilizzando il punteggio CPS (Combined Positive Score), che rappresenta la percentuale di cellule tumorali vitali che mostrano una colorazione di membrana parziale o totale.

### **8.2. Colorazione**

La colorazione immunoistochimica viene eseguita nella piattaforma Dako Autostainer Link 48 con protocollo di colorazione convalidato. I vetrini vengono riscaldati ad una temperatura di 60°C per 30 minuti per essere poi sottoposti a deparaffinazione, reidratazione e recupero del tessuto da analizzare sul modulo di pretrattamento Dako PT Link (Dako No. PT100), utilizzando la soluzione di recupero target Dako EnVision FLEX a pH basso.

La successiva colorazione viene effettuata sulla piattaforma Dako Automated Link 48. I vetrini sono incubati con anticorpo anti-PD-L1 22C3 o con un reagente di controllo negativo per 20 minuti. In seguito, i reagenti polimerici Dako EnVision FLEX+, i quali includono un linker murino, un polimero di perossidasi di rafano, un cromogeno di diaminobenzidina (DAB) e un potenziatore della stessa DAB, sono utilizzati per rilevare la presenza di anticorpi primari. Tra ogni fase di reazione viene applicato il tampone di lavaggio EnVision FLEX+. Dopo la rilevazione degli anticorpi primari, i vetrini sono pronti per essere osservati al microscopio ottico.

Sono necessarie almeno 100 cellule tumorali vitali nel vetrino affinché ci sia un'interpretazione valida del PD-L1. L'espressione del PD-L1 viene valutata dal patologo

come “Combined Positive Score” (CPS), definito come in numero di cellule con colorazione per PD-L1 (tumoriali, linfociti, macrofagi) diviso il numero totale di cellule tumorali vitali nella sezione presa in esame, moltiplicato per 100.

La colorazione della membrana cellulare deve necessariamente avere un'intensità minima di 1+ per essere considerata positiva e questa essere distinta rispetto alla colorazione del citoplasma. La stessa colorazione citoplasmatica non deve essere considerata ai fini della positività per PD-L1 per le cellule neoplastiche.

## 9. Risultati

Gli istotipi esaminati in questa casistica sono i seguenti (Tab. 1):

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| Adenocarcinoma Dotti Salivari*      | 6  |
| Carcinoma Intraduttale              | 1  |
| Adenocarcinoma NOS                  | 1  |
| Carcinoma Mucoepidermoidale**       | 10 |
| Carcinoma Epiteliale-Mioepiteliale* | 2  |
| Carcinoma Cellule Aciniche          | 3  |
| Adenocarcinoma Basaloide            | 1  |
| Carcinoma Adenoideo-cistico*        | 5  |
| Carcinoma Squamocellulare*          | 1  |
| Carcinoma Cellule Chiare            | 1  |
| Adenocarcinoma Non Intestinal Type* | 1  |

\*rappresentano il numero di casi di recidive per istotipi.

Tabella 1. Distribuzione per istotipi delle neoplasie

In totale sono stati valutati 32 casi di neoplasie maligne delle ghiandole salivari. La distribuzione tra sessi è illustrata in Fig.9.

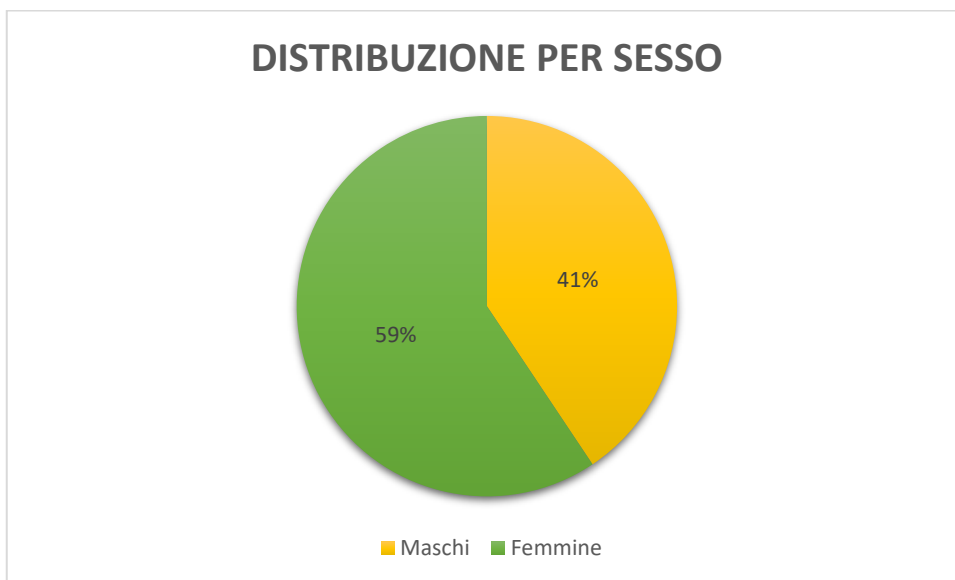


Figura 9. Distribuzione delle neoplasie per sesso

L'intervallo di età è compreso tra 30 e 87 anni, con età media dei pazienti è pari a 59,34 anni e una mediana di 60 anni.

La localizzazione principale risulta essere la parotide con 24 casi, seguita dalle salivari minori con 7 casi e la ghiandola sottomandibolare con 1 caso.

In base alla stadiazione, 7 casi sono al I stadio, 10 al II stadio, 6 al III stadio e 9 al IV stadio (Fig. 10).

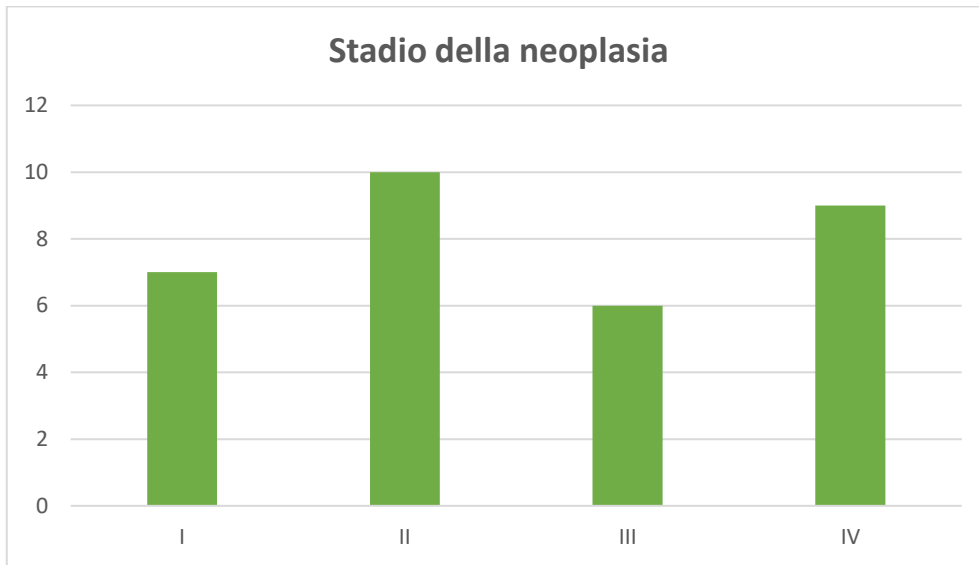


Figura 10. Distribuzione delle neoplasie per stadio della patologia.

In base al grading della neoplasia, 10 sono di alto grado, 8 di grado intermedio e 14 di basso grado. Le recidive esaminate rappresentano il 33,3% dei casi di alto grado, il 25% dei casi di grado intermedio e il 14,3% di basso grado (Fig. 11).

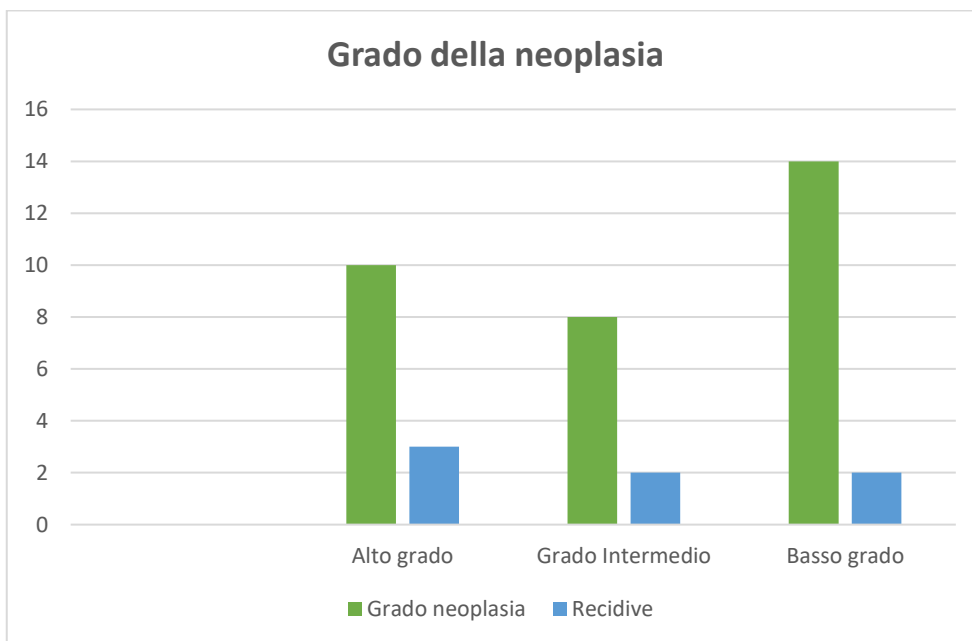


Figura 11. Distribuzione delle neoplasie per grado con relativa distribuzione delle recidive.

I casi sono stati suddivisi per range di espressione di PD-L1 in 4 cut-off:

- CPS Negativo ( $<1$ )
- CPS Positivo ( $\geq 1 - <5$ )
- CPS Positivo ( $\geq 5 - <50$ )
- CPS Positivo forte ( $\geq 50$ )

### **Rapporto CPS-PD-L1 e grading istologico**

Come illustrato in figura 12, dei 14 casi con grado istologico basso, 9 sono negativi, 4 sono positivi  $\geq 1 - <5$  e 1 positivo forte

Degli 8 casi con grado intermedio, 2 sono risultati negativi, 4 positivi  $\geq 1 - <5$  e 2 positivi  $\geq 5 - <50$ .

Dei 10 casi con grado istologico alto, 2 sono negativi, 2 positivi  $\geq 1 - <5$ , 4 positivi  $\geq 5 - <50$  e 2 positivi forte.

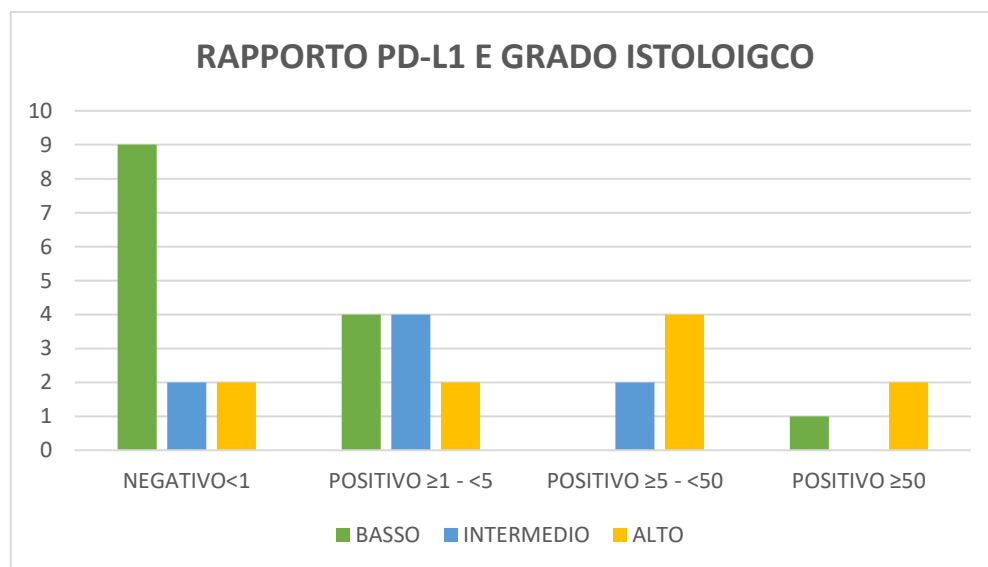


Figura 12. Rapporto PD-L1 e grado istologico.

### **Rapporto PD-L1 e stadio della neoplasia**

Analizzando la relazione tra CPS e stadio, è possibile osservare che l'espressione di PD-L1 nelle neoplasie di stadio I presenta 3 casi negativi, 3 stadi positivi  $\geq 1 - < 5$  e 1 caso positivo  $\geq 5 - < 50$ .

Nelle neoplasie di stadio II, 5 casi risultano negativi, 4 positivi  $\geq 1 - < 5$  e 1 caso positivo forte.

Tra i casi di stadio III, 3 sono negativi, 1 positivo  $\geq 1 - < 5$  e 2 positivi  $\geq 5 - < 50$ .

Dei casi di stadio IV, 2 sono negativi, 2 positivi  $\geq 1 - < 5$ , 3 positivi  $\geq 5 - < 50$  e 2 positivi forte (Figura 13).

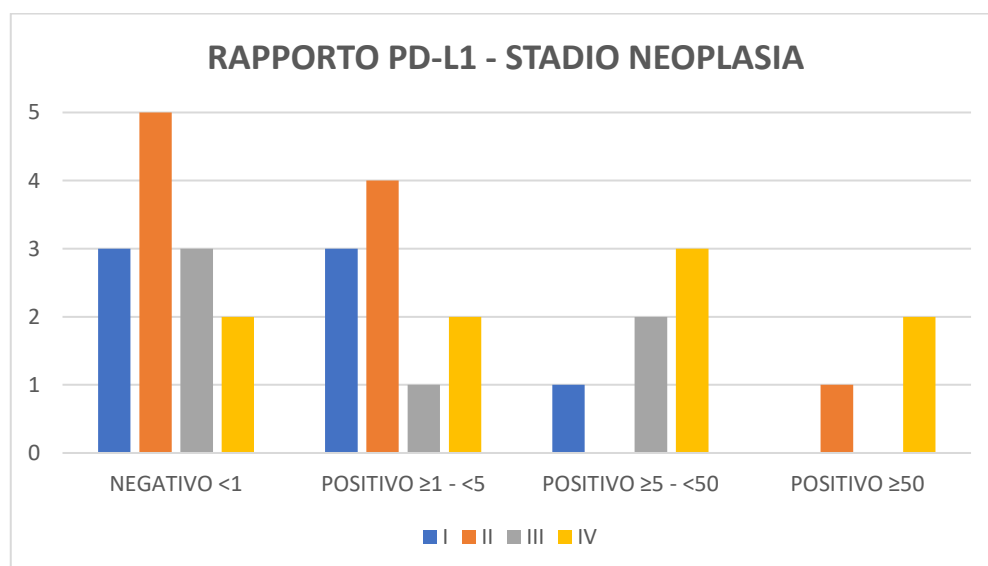


Figura 13. Rapporto PD-L1 e stadio della neoplasia.

### **Rapporto PD-L1 e recidive**

Nell'analizzare i casi di recidive è possibile osservare che l'espressione di PD-L1 è negativa in 3 casi, positiva  $\geq 1 - < 5$  in 1 caso, positiva  $\geq 5 - < 50$  in 2 casi e positiva forte in 1 caso (Figura 14).

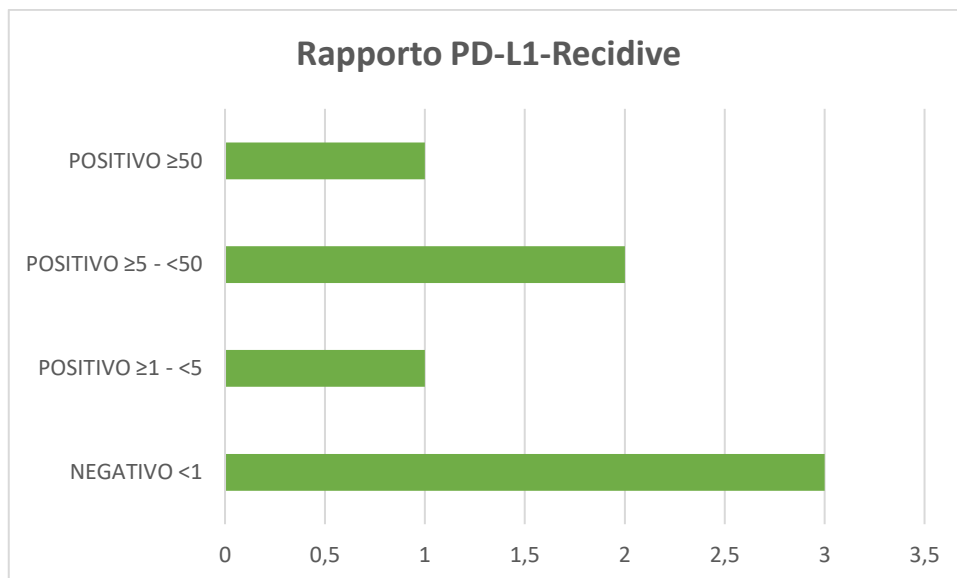


Figura 14. Rapporto PD-L1 e recidive.

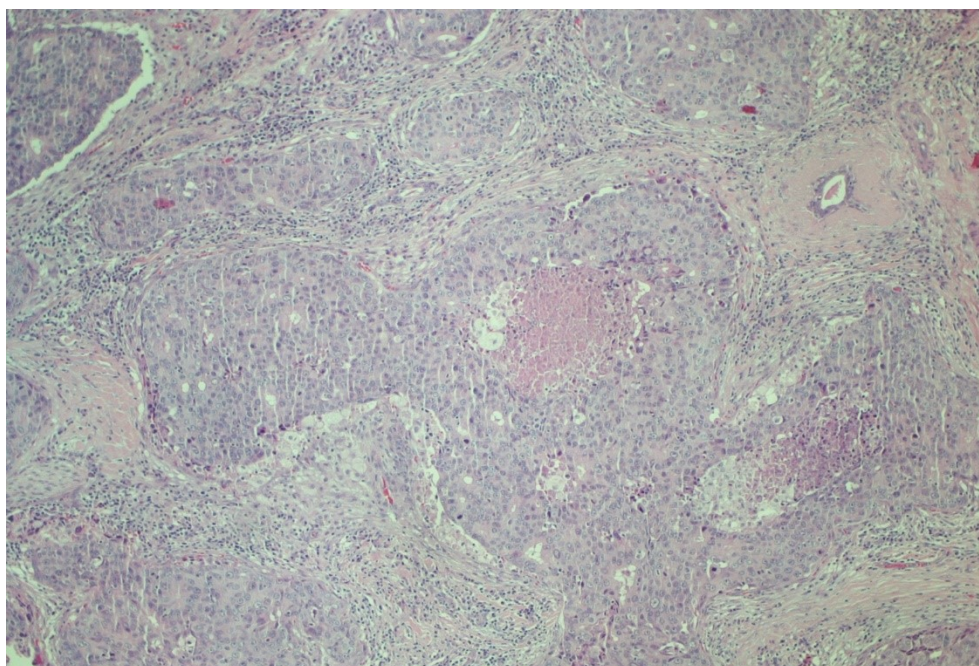


Figura 15. Espressione PD-L1  $\geq 50$ , adenocarcinoma dei dotti salivari di alto grado 20 x.

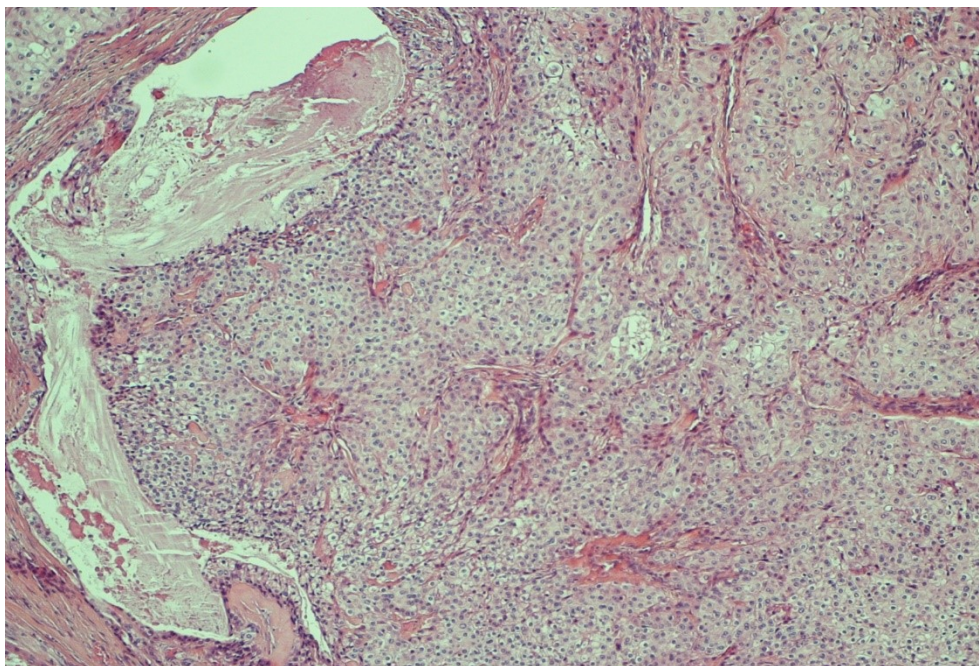


Figura 16. Espressione PD-L1  $\geq 5$  -  $< 50$ , carcinoma mioepiteliale di grado intermedio 20 x.

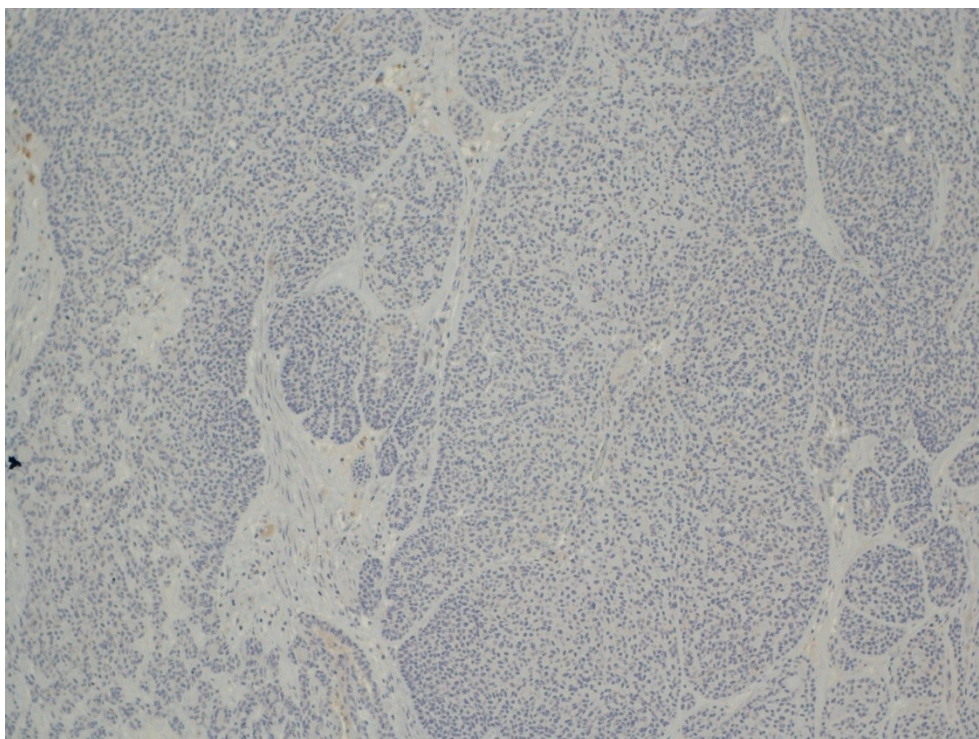


Figura 17. Espressione PD-L1 (negativa), carcinoma a cellule aciniche 20 x.

## **10. Discussione**

L'espressione di PD-L1 nelle neoplasie maligne delle ghiandole salivari mostra valori relativamente elevati in alcuni istotipi come il carcinoma dei dotti salivari, classificato come tumore di alto grado secondo l'attuale classificazione 2022 del WHO (5th edition). PD-L1 mostra un'espressione importante nel 57% dei casi di recidive, particolarmente evidente nei tipi istologici come il carcinoma squamocellulare, carcinoma mioepiteliale e carcinoma dei dotti salivari precedentemente descritto.

È stato dimostrato che le neoplasie maligne con grado istologico intermedio e alto possono associarsi ad una maggiore espressione di PD-L1.

In questo studio è stata presa in considerazione una soglia limite di 1, per indicare come positiva la colorazione del PD-L1. Questa soglia è stata associata ad un'efficacia terapeutica dei farmaci inibitori del checkpoint immunitario. Tuttavia, in altri studi sono stati stabiliti valori soglia diversi per l'efficacia del trattamento e non è stato ancora stabilito un risultato comune. Risulta quindi necessario indagare ulteriormente la relazione tra le soglie dell'espressione PD-L1 e l'efficacia dei trattamenti inibitori del checkpoint immunitario.

## **11. Conclusioni**

I dati dimostrano che i tumori di alto grado e i tumori recidivanti delle ghiandole salivari sono associati ad un aumento di espressione di PD-L1, mentre risulta negativa nella gran parte dei tumori di basso grado. Sebbene siano necessari ulteriori studi per validare tali dati, i risultati del nostro studio suggeriscono che i trattamenti mirati alle vie PD-1/PD-L1 possono diventare di importanza rilevante, in particolare per i casi di neoplasie recidivanti e permettere un ulteriore approccio terapeutico al fine di migliorare il decorso della malattia.

## 12. Bibliografia

1. AL Ladeinde, WL Adeyemo, et al. Salivary gland tumours: a 15-year review at the Dental Center Lagos University Teaching Hospital. *Afr j Med Med Sci*. 2007 Dec;36(4):299-304.
2. Ivica Lukšić, Mišo Virag, et al. Salivary gland tumours: 25 years of experience from a single institution in Croatia. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012 Apr;40(3): e75-81. doi: 10.1016/j.jcms.2011.05.002.
3. Jamie McKenzie, Jamie Lockyer, et al. Salivary gland tumors: an epidemiological review of non-neoplastic and neoplastic pathology. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2023 Jan;61(1):12-18. doi: 10.1016/j.bjoms.2022.11.281.
4. Wen-Chieh Liao, Chuang Chih-Chao, et al. Salivary gland tumors: a clinicopathologic analysis from Taipei Veterans General Hospital. *Ann Plast Surg*. 2020 Jan;84(1S Suppl 1): S26-S33. doi: 10.1097/SAP.0000000000002178.
5. Anna Lilja Aegisdottir, Geir Tryggvason, et al. Salivary gland tumours in Iceland 1986-2015: a nationwide epidemiological analysis over a 30-year time period. *APMIS*. 2021 Feb;129(2):55-60. doi: 10.1111/apm.13090.
6. Takashi Hiyama, Hirofumi Kuno, et al. Imaging of malignant minor salivary gland tumors of the Head and Neck. *Radiographics*, 2021 Jan-Feb;41(1):175-191. doi: 10.1148/rg.2021200062.
7. Jinhua Liu, Zichao Chen, et al. PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors in tumor immunotherapy. *Review Front Pharmacol*. 2021 Sep 1:12:731798. doi: 10.3389/fphar.2021.731798.
8. Xin-wei Qiao, Jian Jiang, et al. The evolving landscape of PD-1/PD-L1 pathway in head and neck cancer. *Front Immunol*. 2020 Sep 18:11:1721. doi: 10.3389/fimmu.2020.01721.
9. Koji Harada, Tarannum Ferdous, Yoshiya Ueyama. PD-L1 expression in malignant salivary gland tumors. *BMC Cancer*. 2018 Feb 6;18(1):156. doi: 10.1186/s12885-018-4069-3.

10. Fernanda de Paula, Tathiane Harumi Nakajima Teshima, et al. Overview of human salivary glands: highlights of morphology and developing processes. *Anat Rec (Hoboken)*. 2017 Jul;300(7):1180-1188. doi: 10.1002/ar.23569.
11. S P Humphrey, R T Williamson. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001 Feb; 85(2): 162-9. doi: 10.1067/mpr.2001.113778.
12. Alejandro M Chibly, Marit H Aure, et al. Salivary gland function, development, and regeneration. *Physiol Rev*. 2022 Jul 1;102(3):1495-1552. doi: 10.1152/physrev.00015.2021.
13. Michael W J Dodds, Dorteia A Johnson, et al. Health benefits of saliva: a review. *J Dent*. 2005 Mar;33(3):223-33. doi: 10.1016/j.jdent.2004.10.009.
14. Alexander T Kessler, Alok A Bhatt. Review of the major and minor salivary glands, Part 1: anatomy, infectious, and inflammatory processes. *J Clin Imaging Sci*. 2018 Nov 15;8:47. doi: 10.4103/jcis.JCIS\_45\_18.
15. Giuseppe Anastasi, Silvano Capitani, et al. *Treatise on human anatomy: Vol.2*. 2010.
16. Diego Manzoni, Eugenio scarnati. *Oral physiology and of the stomatognathic apparatus*, 2011.
17. Toshinori Iwai, Satomi Sugiyama, et al. Clinical anatomy of feeding artery of the submandibular gland. *J Craniofac Surg*. 2022 Oct 1;33(7):2256-2257. doi: 10.1097/SCS.00000000000008613.
18. Houda Boukheris, Marilyn Stovall, et al. Risk of salivary gland cancer after childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. 2013 Mar 1;85(3):776-83. doi: 10.1016/j.ijrobp.2012.06.006. Epub 2012 Jul 24.
19. Ana Carolina Silva Guimarães, Jéssica Vasques Raposo Vedovi, et al. Cytomegalovirus in adenoma and carcinoma lesions: detecting mono-infection and co-infection in salivary glands. *Int J Mol Sci*. 2024 Jul 9;25(14):7502. doi: 10.3390/ijms25147502.

20. Gemma Gatta, Marco Guzzo, et al. Major and minor salivary gland tumours. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2020 Aug; 152:102959. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.102959.
21. Neelam Sood, Swati Meena, et al. Histologic grading of salivary gland mucoepidermoid carcinoma: A comparison of four grading systems and correlation with survival. *J Cancer Res Ther*. 2024 Jan 1;20(1):57-61. doi: 10.4103/jcrt.jcrt\_1341\_22.
22. A Peraza, R Gómez, Mucoepidermoid carcinoma. An update and review of the literature. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2020 Dec;121(6):713-720. doi: 10.1016/j.jormas.2020.06.003.
23. Koji Harada, Tarannum Ferdous, Yoshiya Ueyama. PD-L1 expression in malignant salivary gland tumors. *BMC Cancer*. 2018 Feb 6;18:156. doi: 10.1186/s12885-018-4069-3.
24. Selina Hiss, Markus Eckstein, et al. Tumour-Infiltrating Lymphocytes (TILs) and PD-L1 Expression Correlate with Lymph Node Metastasis, High-Grade Transformation and Shorter Metastasis-Free Survival in Patients with Acinic Cell Carcinoma (AciCC) of the Salivary Glands. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 25;13(5):965. doi: 10.3390/cancers13050965.
25. Yang Wang, Jingzhou Hua, et al. EGFR activation induced Snail-dependent EMT and myc-dependent PD-L1 in human salivary adenoid cystic carcinoma cells. *Cell Cycle*. 2018;17(12):1457-1470. doi: 10.1080/15384101.2018.1489177.
26. Hanno M. Witte, Niklas Gebauer, et al. Prognostic Impact of PD-L1 Expression in malignant salivary gland tumors as assessed by established scoring criteria: tumor proportion score (TPS), combined positivity score (CPS), and immune cell (IC) infiltrate. *Cancers (Basel)*. 2020 Apr 3; 12(4): 873. doi: 10.3390/cancers12040873.
27. Bin Xu, Achim A Jungbluth, et al. Immune microenvironment and expression of PD-L1, PD-1, cancer testis antigen PRAME and MHC I in salivary duct carcinoma. *Histopathology*. 2019 Nov;75(5):672-682. doi: 10.1111/his.13944.

28. Daniela Fonte, Lúcia Nunes Aguas, et al. Epithelial-myoepithelial carcinoma of parotid gland: a tumor of low grade malignancy? *Acta Med Port.* 2011 Dec;24 Suppl 3:675-80.
29. Christopher Cormier, Shweta Agarwal, Myoepithelial carcinoma ex-pleomorphic adenoma: a rare pathology misdiagnosed as pleomorphic adenoma; with a novel TERT promoter mutation and high PD-L1 expression. *Head Neck Pathol.* 2021 Jun 14;16(1):322–330. doi: 10.1007/s12105-021-01346-0.
30. Naiyer A Rizvi, Matthew D Hellmann, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science.* 2015 Apr 3;348(6230):124-8. doi: 10.1126/science.aaa1348.
31. Matthew M Gubin, Matthew D Vesely. Cancer immunoediting in the era of immuno-oncology. *Clin Cancer Res.* 2022 Sep 15;28(18):3917-3928. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-1804.
32. O. J. Finn. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol.* 2012 Sep;23 (Suppl 8):viii6-9. doi: 10.1093/annonc/mds256.
33. Chunxiao Li, Ping Jiang, et al. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Mol Cancer.* 2020 Jul 17;19(1):116. doi: 10.1186/s12943-020-01234-1.
34. Chinmoy Ghosh, Gary Luong, Yue Sun. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J Cancer.* 2021 Mar 5;12(9):2735–2746. doi: 10.7150/jca.57334.
35. Yanyan Han, Dandan Liu, Lianhong Li. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res.* 2020 Mar 1;10(3):727–742.
36. Yuan Gao, Yingfang Feng, et al. Immune-independent acquired resistance to PD-L1 antibody initiated by PD-L1 upregulation via PI3K/AKT signaling can be reversed by Anlotinib. *Cancer Med.* 2023 Jul;12(14):15337-15349. doi: 10.1002/cam4.6195.
37. Zihan Quan, Yang Yang, et al. Clinical implications of the interaction between PD-1/PD-L1 and PI3K/AKT/mTOR pathway in progression and treatment of non-small cell lung cancer. *J Cancer.* 2022 Oct 3;13(13):3434–3443. doi: 10.7150/jca.77619.

38. Robert W Lentz, Meryl D Colton, et al. Innate Immune Checkpoint Inhibitors: The Next Breakthrough in Medical Oncology? *Mol Cancer Ther*. 2021 Jun;20(6):961-974. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0041.
39. Caroline Even, Jean-Pierre Delord, et al. Evaluation of pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated advanced salivary gland carcinoma in the phase 2 KEYNOTE-158 study. *Eur J Cancer*. 2022 Aug; 171:259-268. doi: 10.1016/j.ejca.2022.05.007.
40. Roger B Cohen, Jean-Pierre Delord, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Advanced Salivary Gland Carcinoma: Findings of the Phase 1b KEYNOTE-028 Study. *Am J Clin Oncol*. 2018 Nov;41(11):1083-1088. doi: 10.1097/COC.0000000000000429.
41. Jianyun Jiang, Bin Wu, et al. Anlotinib reversed resistance to PD-1 inhibitors in recurrent and metastatic head and neck cancers: a real-world retrospective study. *Cancer Immunol Immunother*. 2024 Aug 6;73(10):199. doi: 10.1007/s00262-024-03784-5.
42. Julie R Brahmer, Scott S Tykodi, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2455-65. doi: 10.1056/NEJMoa1200694.

## **Ringraziamenti**

Per prima cosa, vorrei ringraziare il mio relatore, il Prof. Corrado Rubini per la sua disponibilità, la sua pazienza e la sua umanità, qualità purtroppo sempre più spesso sottovalutate.

Ringrazio il Dott. Marco Santarelli per avermi messo a disposizione la documentazione necessaria ed avermi aiutato in aspetti tecnici per la raccolta dati.

Un ringraziamento speciale alla mia ragazza Federica, senza la quale non sarei riuscito a superare momenti difficili e insormontabili. Grazie per avermi reso una persona migliore.

Ringrazio Emma e Gaetano, per avermi fatto sentire parte di una seconda famiglia dal primo giorno.

Ci tengo a ringraziare tutti i miei amici, che mi hanno sostenuto, mi hanno fatto sorridere ed hanno sempre avuto le parole giuste al momento giusto per tirarmi su di morale.

Infine, voglio ringraziare i miei zii Giorgio e Manuela, mio fratello Patrizio, sua moglie Miriam, mia madre e mio padre, al quale dedico questo traguardo, col rammarico che tu non sia riuscito a goderne a pieno come avresti voluto, ma con la sicurezza che ovunque tu sia in questo momento, tu abbia stampato in viso un sorriso orgoglioso per ciò che ho raggiunto e per tutto quello che mi aspetterà d'ora in poi. Grazie di tutto.