



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE**

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

**Un nuovo approccio per la diagnosi del tumore triplo-negativo
del seno (TNBC): confronto fra analisi istologica e spettroscopia
FTIR Imaging**

**A new approach for the diagnosis of triple-negative breast
cancer (TNBC): a comparison between histological analysis and
FTIR Imaging spectroscopy**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Eleonora Sperindei

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa

Elisabetta Giorgini

Correlatori:

Prof. **Alfredo Santinelli**

Dr.ssa **Valentina Notarstefano**

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2020/2021

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE.....	3
1.1. La ghiandola mammaria: anatomia, fisiologia e istologia.....	5
1.2. Cancro della mammella.....	11
<i>1.2.1. Classificazioni del cancro della mammella.....</i>	<i>13</i>
1.3. Carcinoma Duttale Invasivo (IDC).....	16
<i>1.3.1. Carcinomi Duttali Invasivi No Special Type (IDC NST) e sottotipi specifici.....</i>	<i>17</i>
<i>1.3.2. Origine del tumore e progressione.....</i>	<i>22</i>
<i>1.3.3. Diagnosi e stadiazione.....</i>	<i>24</i>
<i>1.3.4. Altri parametri prognostici.....</i>	<i>26</i>
<i>1.3.5. Trattamento e tassi di sopravvivenza.....</i>	<i>28</i>
1.4. Triple Negative Breast Cancer.....	31
<i>1.4.1. Classificazioni.....</i>	<i>32</i>
<i>1.4.2. Decorso e sopravvivenza.....</i>	<i>35</i>
<i>1.4.3. Diagnosi e trattamento.....</i>	<i>38</i>
1.5. Spettroscopia FTIR Imaging.....	40
<i>1.5.1. Principi teorici.....</i>	<i>40</i>
<i>1.5.2. Regioni dello spettro IR.....</i>	<i>48</i>
<i>1.5.3. Analisi vibrazionale di sistemi biologici.....</i>	<i>50</i>

1.6. La spettroscopia infrarossa applicata a problematiche oncologiche.....	52
2. SCOPO DELLA TESI.....	57
3. MATERIALI E METODI.....	58
3.1. Raccolta dei campioni di tessuto.....	59
3.2. Preparazione dei campioni.....	61
3.3. Analisi istologica.....	62
3.4. Spettrometro FTIR.....	63
3.5. Analisi FTIR-HSI.....	66
3.5.1. <i>Analisi FTIR Imaging</i>	68
3.5.2. <i>Analisi multivariata</i>	68
3.5.3. <i>Analisi univariata</i>	68
4. RISULTATI.....	70
4.1. Analisi istologica.....	70
4.2. Analisi FTIR Imaging.....	74
4.3. Analisi univariata.....	77
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	85
6. RINGRAZIAMENTI.....	90
7. BIBLIOGRAFIA.....	92

1. INTRODUZIONE

Il cancro della mammella è un tumore molto comune e rappresenta la principale causa di morte per cancro nelle donne. Si origina da diversi tipi di cellule del seno e per questo motivo presenta una grande variabilità, sia a livello di diagnosi che di prognosi. Risulta quindi di fondamentale importanza fornire un'accurata caratterizzazione istopatologica di tale neoplasia, in modo da valutarne la natura benigna o maligna, e quindi definire il successivo trattamento chirurgico e/o farmacologico.

Sebbene negli ultimi anni siano stati compiuti enormi progressi nella diagnosi e nel trattamento di questo tipo di tumori, a tutt'oggi ci sono ancora alcuni sottotipi che risultano poco conosciuti e la cui classificazione è molto complessa. Tra questi, particolare interesse sta riscuotendo il Tumore Triplo Negativo (Triple Negative Breast Cancer, TNBC), a causa della difficoltà di diagnosi precoce e della non sempre positiva risposta ai comuni trattamenti farmacologici, che necessitano sempre più di essere personalizzati in base al tipo di lesione da trattare.

In quest'ottica, durante il mio periodo di tesi di laurea mi sono dedicata allo studio di sezioni chirurgiche di Carcinoma Invasivo Duttale (IDC) con classificazione fenotipica di Triplo Negativo (TNBC), raccolti da pazienti consenzienti di varia età. Lo studio è stato condotto affiancando la

spettroscopia FTIR Imaging all'analisi istologica, in modo da correlare le informazioni morfologiche con la composizione macromolecolare del campione. I dati spettrali e morfologici della massa tumorale sono stati comparati (1) con quelli del tessuto ghiandolare sano per individuare specifici marker spettrali identificativi della lesione neoplastica e (2) con quelli dell'adiacente tessuto connettivo, per valutare come la crescita del tumore potesse influenzare il microambiente confinante.

1.1. La ghiandola mammaria: anatomia, fisiologia e istologia

Le mammelle sono organi accessori specializzati dell'apparato genitale femminile. La mammella umana si sviluppa dalle cellule dell'ectoderma a partire dalla quarta settimana di gestazione sotto l'influenza sia genetica che ormonale [1], ma solo nel periodo peripuberale si avrà differenziazione tra uomo e donna. Mentre la mammella maschile formata principalmente da grasso e tessuto stromale, per azione antagonista degli androgeni, tende ad involuzione o atrofia, in quella femminile, gli estrogeni permettono la proliferazione di grasso e lo sviluppo del sistema duttale. I cambiamenti del tessuto mammario seguono quindi tutte le fasi della vita di ogni donna, a partire dall'adolescenza all'età fertile, la gestazione, l'allattamento e infine la menopausa [2].

La costituzione anatomica della mammella comprende la pelle e il tessuto sottocutaneo, il parenchima mammario ghiandolare (dotti e lobuli) e lo stroma fibroso di supporto, con il tessuto adiposo tra legamenti, nervi, linfonodi, arterie e vene. Le ghiandole mammarie si trovano sulla parte anteriore del torace, e si estendono dalla seconda costola superiore alla sesta inferiore, con lo sterno in posizione mediale e la linea medio-ascellare laterale (Figura 1.1). Sono posizionate nel tessuto sottocutaneo del cuscinetto adiposo pettorale; nella parte superiore sovrastano il muscolo grande pettorale, lateralmente il

muscolo anteriore serrato (o dentato) e nella parte inferiore i muscoli obliqui addominali superiori [2].

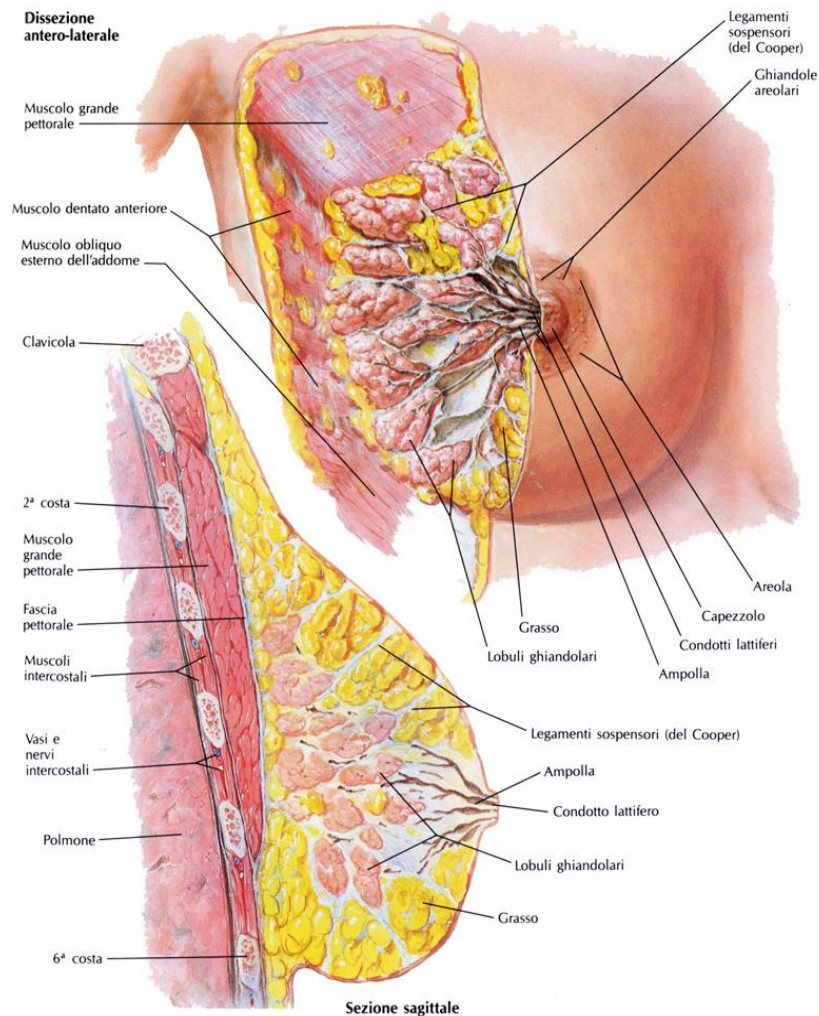


Figura 1.1. Anatomia della mammella (<https://senologiadiagnostica.it>).

Il parenchima ghiandolare della mammella è diviso in lobi (circa 15-20, per ogni mammella) ciascuno dei quali è suddiviso a sua volta in numerosi lobuli secernenti (Figura 1.2) [3]. I dotti lobulari di ogni lobo convergono in un

unico dotto galattoforo, che convergono a loro volta nel seno galattoforo, per aprirsi sulla superficie corporea a livello del capezzolo. Il capezzolo è la sporgenza conica con la quale ogni mammella termina anteriormente (Figura 1.1); il capezzolo è circondato dall'areola, di aspetto granulare per la presenza di grosse ghiandole sebacee nel derma sottostante [4].

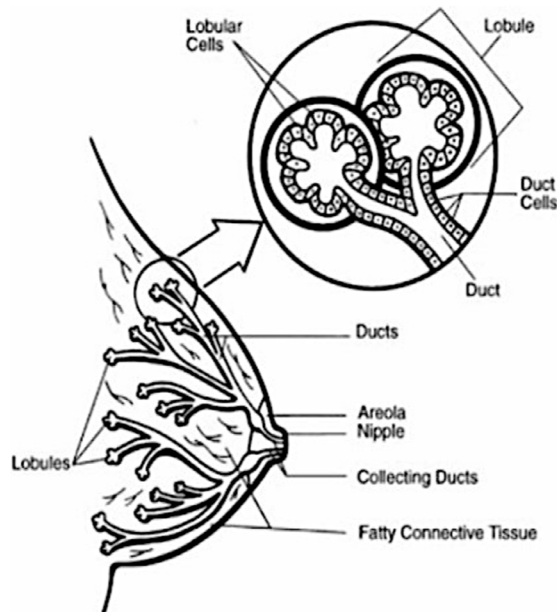


Figura 1.2. Lobi e lobuli.

Il derma della cute sovrastante la mammella si connette al tessuto sottostante attraverso estensioni fibrose di tessuto connettivo denso, il quale circonda il sistema dei dotti e crea setti tra i lobi e i lobuli: sono i legamenti sospensori della mammella o legamenti di Cooper (chiamati in onore a Sir Astley

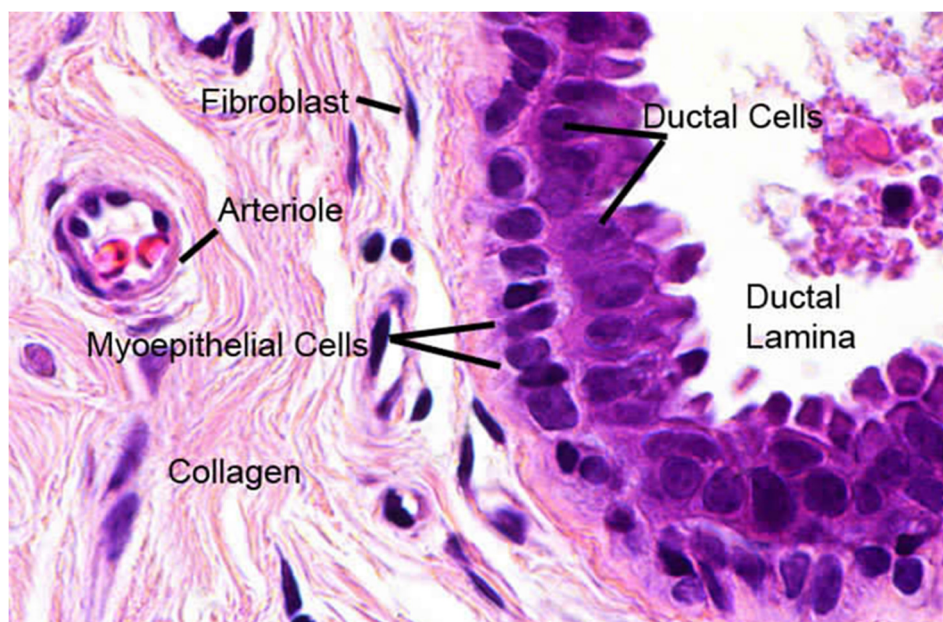
Cooper, che ha compreso e pubblicato l'anatomia della mammella nel suo manuale nel 1840) [5] (Figura 1.1).

La vascolarizzazione delle ghiandole mammarie avviene principalmente ad opera di rami dell'arteria toracica interna, delle arterie intercostali e dell'arteria toracica laterale. I plessi venosi sono principalmente due: uno corre parallelo all'anatomia arteriosa, nei tessuti profondi, mentre il secondo diverge superficialmente ed è sottocutaneo. Quest'ultimo plesso, quiescente in condizioni normali, diventa funzionalmente importante in condizioni patologiche [6].

Il drenaggio linfatico della mammella segue il sistema venoso: comprende linfonodi intramammari e ascellari e origina dalle pareti dei dotti mammari e dal tessuto connettivo interlobulare. I linfonodi normali sono ipervascolari e tipicamente hanno una corteccia sottile (< 3mm) leggermente lobulata e un ilo ripieno di grasso [2]. Il drenaggio linfatico gioca un ruolo primario nello sviluppo delle metastasi nel carcinoma della mammella [7].

Le ghiandole mammarie sono ghiandole sudoripare tubulo alveolari modificate. Sono costituite da un doppio strato epiteliale contenuto all'interno di un tessuto adiposo attivo e supportate di una struttura lassa di tessuto connettivo fibroso. Il doppio strato epiteliale comprende due distinti tipi di

cellule (Figura 1.3). Le cellule cuboidali luminali formano la porzione interna e rivestono i dotti galattofori, creando un epitelio squamoso stratificato. Più in profondità, nel tessuto connettivo, i dotti acquisiscono un aspetto colonnare stratificato, che in realtà non è altro che una cellula del dotto cuboidale “seduta” su una cellula mioepiteliale [8]: la porzione esterna del doppio strato è quindi costituita da cellule mioepiteliali. Queste cellule a forma di fuso hanno proprietà di cellule muscolari lisce e partecipano al processo di espulsione del latte durante l'allattamento. Insieme, i componenti epiteliali della ghiandola mammaria costituiscono dal 10 al 15% del suo volume complessivo [9].



*Figura 1.3. Immagine ad alto ingrandimento di sezione di tessuto mammario inattivo
(<http://robbiewilson.50webs.com/>).*

La variazione delle dimensioni del seno tra le donne è correlata al volume del tessuto adiposo piuttosto che alla componente epiteliale stessa. Il tessuto adiposo è abbondante negli spazi interlobulari, mentre la sua presenza nello stroma intralobulare è scarsa (Figura 1.4). Il tessuto adiposo regola attivamente l'omeostasi della ghiandola mammaria, poiché partecipa alla crescita epiteliale, alla comunicazione intercellulare, all'angiogenesi e alla produzione di latte. Inoltre, funge da serbatoio di fluidi interstiziali, incluse molecole di derivazione locale (ad esempio la prolattina) e quelle sintetizzate altrove [10,11].

Anche i fibroblasti sono componenti importanti dello stroma mammario (Figura 1.3). Queste cellule si trovano solitamente vicino al lato basale dell'albero ramificato epiteliale. Hanno varie funzioni, tra cui la sintesi del fattore di crescita, la produzione di metalloproteinasi (MMP) e la deposizione di matrice extracellulare (ECM). L'ECM è costituita da collagene di tipo I e III, proteoglicani, acido ialuronico, fibronectina e tenascine. Supporta attivamente la sopravvivenza epiteliale sopprimendo l'apoptosi, partecipa alla ramificazione secondaria e terziaria dei dotti mammari e alla soppressione del tumore mantenendo la membrana basale intatta. Le membrane basali sono sottili fogli di 100 nm di glicoproteine e proteoglicani, laminine e fibrille di collagene IV [12,13].

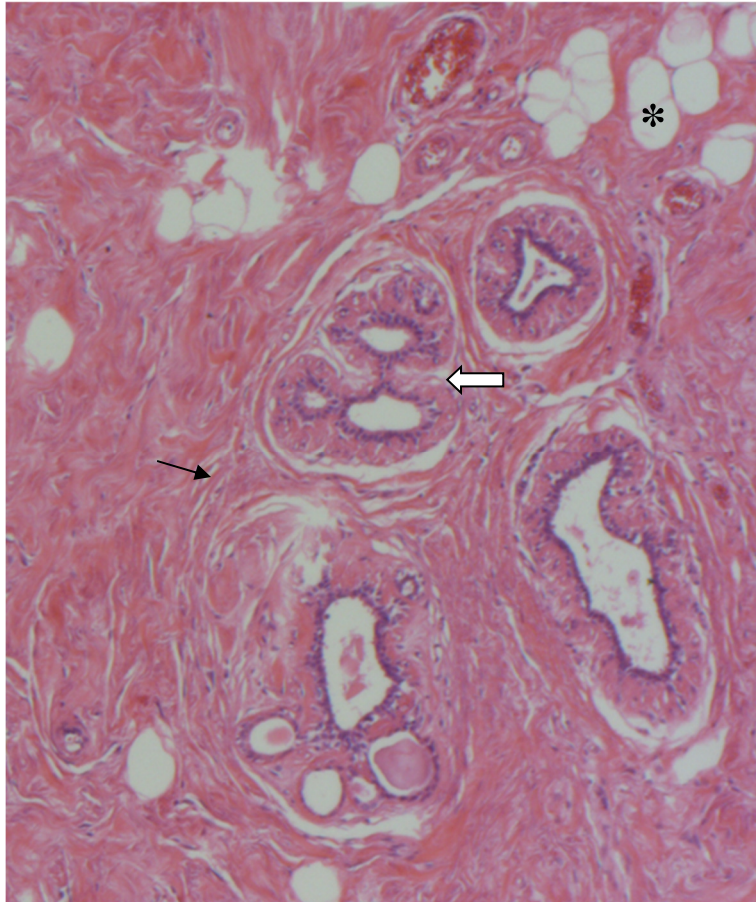


Figura 1.4. Immagine H&E di tessuto mammario: adipociti (), stroma di supporto (freccia nera) e dotti (freccia bianca).*

1.2. Cancro della mammella

Il cancro della mammella rappresenta la causa più comune di cancro nelle donne [4,14]. Ogni anno negli Stati Uniti vengono riportati oltre 266.000 nuovi casi e si stima che una donna su 8 andrà incontro a cancro al seno in una certa fase della sua vita [15]. In generale, l'incidenza è maggiore dopo i 50 anni di età, anche se negli ultimi anni si è visto un aumento drammatico di

casi in giovani donne, con andamento maggiormente aggressivo: in tutto il mondo in media il 5% di diagnosi si ha in età inferiore ai 40 anni. In questi casi il cancro al seno è indiscutibilmente la causa maggiore di morte [4,16].

L'aumento dell'incidenza del cancro della mammella ha spinto la ricerca verso l'individuazione di fattori di rischio potenzialmente connessi e lo sviluppo di strategie di prevenzione. Considerando come criterio la possibilità di influenzare e limitare il processo di trasformazione neoplastico, i fattori di rischio possono essere suddivisi in fattori intrinseci ed estrinseci. Il primo gruppo comprende parametri indipendenti, non controllabili, come l'età, il sesso, la razza, la predisposizione genetica, la storia familiare o l'insorgenza di lesioni proliferative benigne dalla ghiandola mammaria. Il secondo gruppo è influenzato dallo stile di vita, dall'alimentazione o da terapie ormonali come contraccettivi, e la loro influenza sul processo neoplastico può essere migliorata (Figura 1.5) [15,17,18].

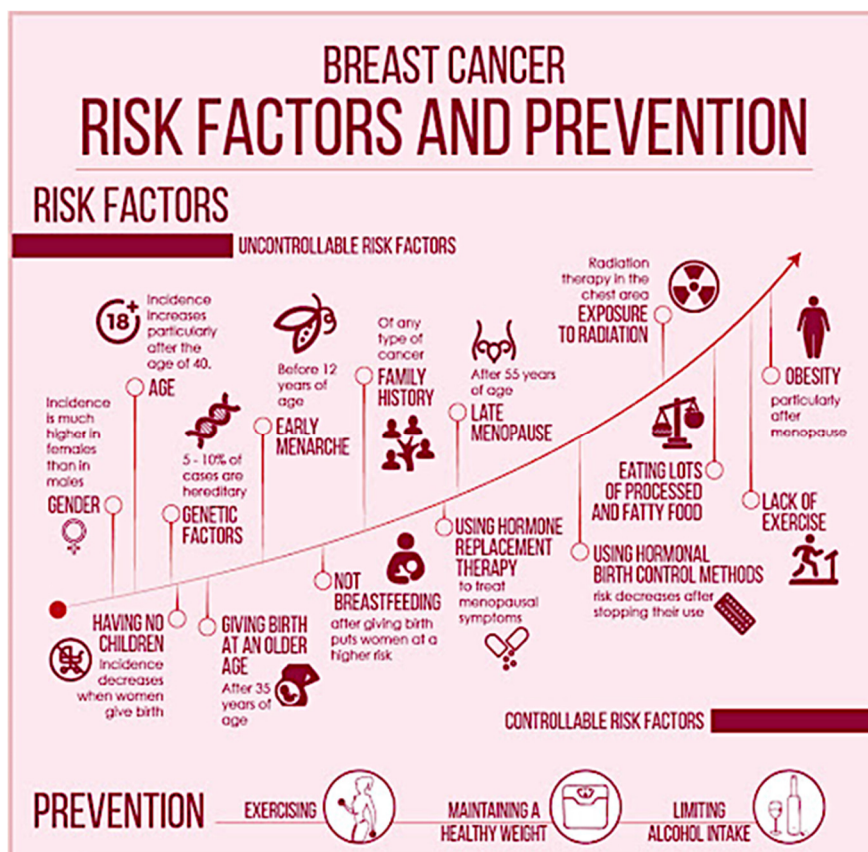


Figura 1.5. Fattori di rischio per cancro alla mammella (www.jbcp.jo).

1.2.1. Classificazioni del cancro della mammella

Il cancro alla mammella è una malattia estremamente eterogenea, con quadro clinico differente anche in relazione alla risposta a interventi terapeutici e con caratteristiche biologiche e istopatologiche variabili [19].

Il tipo di cancro è determinato dalle cellule specifiche che ne sono interessate e può presentarsi nei dotti, nei lobuli o nel tessuto tra di essi. Sulla base dell'origine cellulare, i tumori al seno possono essere classificati inizialmente in due modi: carcinomi e sarcomi. I carcinomi originano dalla componente

epiteliale della mammella, cioè dalle cellule che rivestono i lobuli e i dotti terminali. I sarcomi invece sono forme molto più rare, meno dell'1% dei tumori della mammella primari, e originano dalle componenti stromali, tra le quali miofibroblasti e cellule dei vasi sanguigni. In alcuni casi, lo stesso tumore alla mammella può essere generato da una combinazione di diversi tipi cellulari, ampliando notevolmente la necessità di categorizzazione [15,20].

La classificazione istopatologica del carcinoma della mammella è basata sulla diversa morfologia dei tumori e sulla loro invasività dalle sedi del tumore primario: non invasivi o *in situ*, invasivi e metastatici. Questi ultimi, chiamati anche di stadio IV o avanzati, sono tumori diffusi ad altri organi del corpo, come polmone, fegato, osso e cervello, o nei linfonodi dell'ascella. La diagnosi della forma metastatica può essere iniziale o successiva a un trattamento. Circa il 30% delle donne con diagnosi di tumore alla mammella in fase precoce può sviluppare successive metastasi, in seguito alla formazione delle quali sarà difficile una rimozione totale [15,21].

Il carcinoma della mammella *in situ* è confinato all'area di origine e non invade il tessuto connettivo o adiposo circostante (Figura 1.6) [22]. Può essere ulteriormente classificato in duttale (DCIS), molto comune, o lobulare (LCIS) in base al pattern di crescita e alle caratteristiche citologiche. Il duttale

presenta cinque sottotipi architettonici, distinguibili, tramite microscopio ottico, in base alla modalità di crescita.

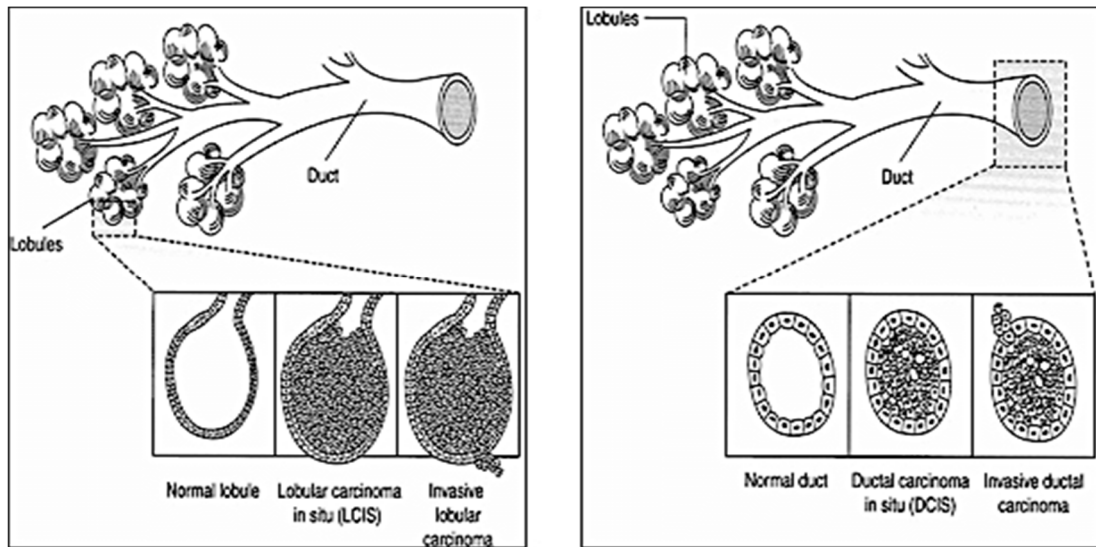


Figura 1.6. Stadi coinvolti nello sviluppo del cancro al seno.

I tumori invasivi sono un gruppo istologico eterogeneo. Le loro cellule attraversano la parete dei dotti e/o dei lobuli e invadono i tessuti circostanti (Figura 1.6). Il carcinoma duttale infiltrante (IDC) rappresenta la maggior parte di tutti gli invasivi e verrà approfondito di seguito [19,23,24].

Lo schema di classificazione sopra descritto si basa esclusivamente sull'istologia. Con l'avanzamento delle tecniche chirurgiche che permettono una terapia conservativa del seno, è stato essenziale sviluppare una classificazione più accurata, basata anche sul rischio relativo di recidiva o progressione, introducendo markers molecolari quali ER, PR, ErbB2

(Her2/neu) e p53 (Figura 1.7) [23]. Questa nuova classificazione, basata sull'analisi dell'espressione genica tramite microarray e clustering gerarchico, ha permesso l'identificazione di nuovi sottotipi molecolari, con differenze altamente significative nella predizione della sopravvivenza globale, così come della sopravvivenza libera da malattia. Il sottotipo *basal-like/triple-negative* con pattern ER-/PR-/ErbB2- è quello che causa sopravvivenza minore [19,23,25-28].

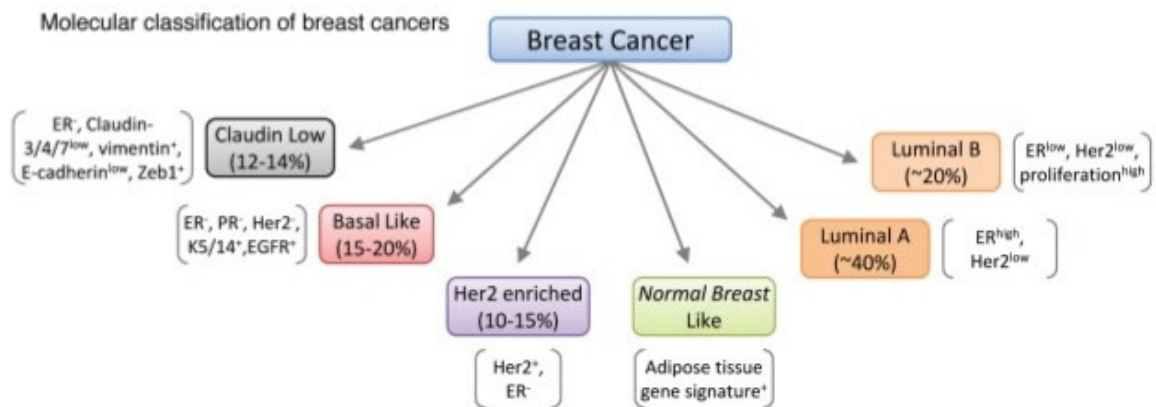


Figura 1.7. Classificazione molecolare del cancro alla mammella.

1.3. Carcinoma Duttale Invasivo (IDC)

Il carcinoma duttale invasivo (IDC) è la forma più comune di cancro invasivo alla mammella. Rappresenta il 55% dell'incidenza di cancro al seno al momento della diagnosi [29] e il 70-80% di tutti gli invasivi [15].

I carcinomi duttali invasivi sono tumori con proliferazione duttale maligna e invasione stromale in presenza o assenza di DCIS. Rappresentano un gruppo eterogeneo di tumori, definiti dalla loro morfologia, che trova comunque riscontro in differenti caratteristiche cliniche, epidemiologiche e molecolari [30].

Alcuni di essi hanno caratteristiche distintive e comportamenti particolari, tali da essere classificati come sottotipi speciali, mentre la maggior parte, circa il 75% dei IDC, non presenta caratteristiche morfologiche sufficienti per essere classificato come tipo istologico specifico. Per questo motivo, viene generalmente designato come IDC NOS (*Not Otherwise Specified*), o meglio IDC NST (*No Special Type*), secondo la modifica della WHO nel 2012 [30,31,32], perché l'uso di "duttale" si basa su ipotesi istogenetiche non dimostrate per questo gruppo eterogeneo di tumori [33].

1.3.1. Carcinomi Duttali Invasivi No Special Type (IDC NST) e sottotipi specifici

Le donne di età inferiore ai 35 anni sono più frequentemente colpite dall'istotipo NST rispetto alle più anziane. Gli NST si presentano di solito con un'ampia gamma di variazioni morfologiche e comportamenti clinici, come

dimensioni del tumore, grado, proporzione relativa di cellule tumorali e stroma, e tipi di margini. La mammografia o l'ecografia evidenziano solitamente una lesione irregolare, di densità aumentata rispetto al parenchima circostante. Macroscopicamente, il tumore è compatto, ben demarcato o a limiti indistinti, di forma stellata o nodulare. Gli epitelii mostrano eterogeneità di crescita: trabecole, nidi, cordoni o cellule distribuite singolarmente con quantità variabile di differenziazione duttale, da oltre il 70% del tessuto tumorale alla completa assenza. Le cellule tumorali sono pleomorfe, variano per forma e dimensione, e presentano solitamente nucleoli prominenti e numerose mitosi. Le aree di necrosi e calcificazione possono essere rilevate nel 60% dei casi, e sono proporzionali al grado di differenziazione della neoplasia. Talvolta sono presenti focolai di metaplasia squamosa o metaplasia apocrina. La quantità di stroma desmoplastico è variabile, da nulla ad abbondante (Figura 1.8a) [34,35].

La maggior parte (dal 70 all'80%) dei carcinomi NST sono ER+; il 15-20% è HER2+. La sopravvivenza a 10 anni delle pazienti portatrici di carcinoma NST va dal 35% al 50% ed è condizionata dallo stadio della neoplasia (che include lo status-linfonodale), dal grado di differenziazione e dalla presenza/assenza di invasione linfovaskolare [24].

Fanno parte degli NST: il carcinoma pleomorfo, il carcinoma con cellule giganti stromali *osteoclast-like*, il carcinoma con caratteristiche coriocarcinomatose, il carcinoma con caratteristiche melanotiche [30].

Invece, i sottotipi specifici più comuni comprendono:

- il carcinoma lobulare invasivo (ILC), variante dal classico per prognosi, *grading* e sottotipo cellulare (Figura 1.8b) [36];
- il carcinoma mucinoso, nominato in questo modo per la presenza di mucina extracellulare, che costituisce almeno il 33% della lesione, e per la differenziazione mucinosa, che costituisce non meno del 90% del tessuto tumorale (Figura 1.8c) [32];
- il carcinoma metaplastico, che rappresenta un gruppo di tumori mammari invasivi aggressivi non correlati tra loro, che mostrano differenziazione delle cellule tumorali in elementi squamosi o dall'aspetto mesenchimale (Figura 1.8d); i carcinomi metaplastici sono tipicamente tumori tripli negativi, ma a volte con prognosi peggiore [37,38];
- il carcinoma papillare, considerato un adenocarcinoma della mammella particolarmente differenziato, con morfologia papillare non inferiore al 90% nella componente invasiva;

- il carcinoma micropapillare, carcinoma mammario di tipo luminale con aggregati di piccoli ammassi epiteliali disposti in strutture pseudopapillari, propensione all'invasione linfovascolare e alle metastasi linfonodali regionali, manifestazione di un comportamento invasivo (Figura 1.8e) [39];
- i carcinomi con caratteristiche di tipo midollare, un gruppo di tumori con aspetto più o meno "midollare", caratteristiche morfologiche e immunoistologiche sovrapposte. L'esito relativamente buono di questi carcinomi è attribuito alla presenza di un prominente infiltrato linfoplasmocitario (Figura 1.8f) [40];
- il carcinoma tubulare e il carcinoma cribriforme, nominati per la proliferazione di cellule tumorali uniformi con aspetto tubulare, anche multifocale, o cribroso, hanno prognosi particolarmente favorevole e presentano caratteristiche nucleari simili ai tumori di basso grado [41];
- i carcinomi con differenziazione apocrina, diversi tumori che dovrebbero essere classificati in base al loro tipo invasivo primario, sono frequentemente negativi per i recettori degli estrogeni e del progesterone, di alto grado con prognosi infausta [42];
- i carcinomi con caratteristiche neuroendocrine, presentano appunto caratteristiche morfologiche e immunoistochimiche simili a quelle dei

tumori neuroendocrini (NET) del tratto gastrointestinale e del polmone ed hanno più del 50% di cellule tumorali che esprimono i marcatori neuroendocrini [32,43].

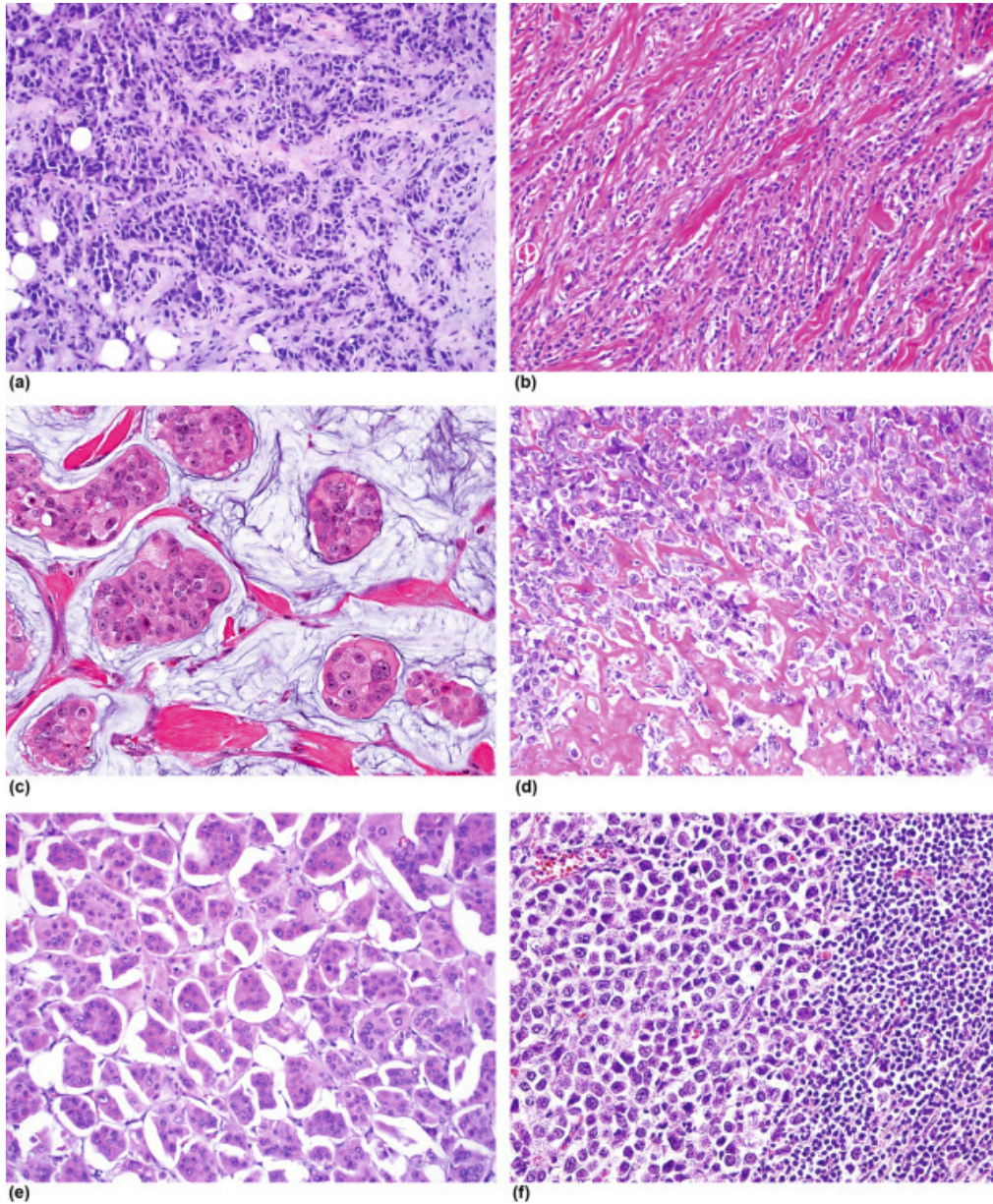


Figure 1.8. (a) IDC NOS. (b) Carcinoma invasivo lobulare. (c) Carcinoma mucinoso invasivo. (d) Carcinoma metaplastico invasivo. (e) Carcinoma micropapillare invasivo. (f) Carcinoma invasivo con caratteristiche midollari.

1.3.2. Origine del tumore e progressione

L'esatto meccanismo con cui si genera il cancro al seno è sconosciuto; tuttavia, molti sforzi sono stati fatti per caratterizzarlo da un punto di vista molecolare e delinearne la sua formazione e progressione.

Un'area emergente della ricerca riguarda l'isolamento e la caratterizzazione delle cellule staminali del cancro al seno (CSCs), in quanto considerate come cellule iniziatrici del processo tumorale [44]. Sappiamo infatti dalla teoria delle cellule staminali tumorali che all'interno di una massa tumorale esiste un piccolo sottoinsieme di cellule responsabili dell'avvio e della progressione del processo tumorale, cellule che mostrano proprietà staminali, mentre la restante massa cellulare ha un basso potenziale tumorigenico [45,46].

Ancora oggi non è conosciuta con certezza l'origine delle CSCs ma due sono le ipotesi: dalle cellule staminali stesse o da cellule interne alla gerarchia delle cellule staminali, raggiungendo il potenziale di cellule staminali attraverso un processo di "dedifferenziazione" [47-49].

A livello morfologico, il decorso naturale del cancro alla mammella comporta la progressione attraverso fasi patologiche e cliniche definite, a partire da iperproliferazione duttale, con successiva evoluzione *in situ* e in carcinomi invasivi, fino alla malattia metastatica [49,50].

In Figura 1.9 è riportato un modello di ipotetica progressione di tumore al seno [49]: la probabilità di progressione in carcinoma infiltrante/invasivo varia con il sottotipo istologico, il grado di differenziazione e l'estensione.

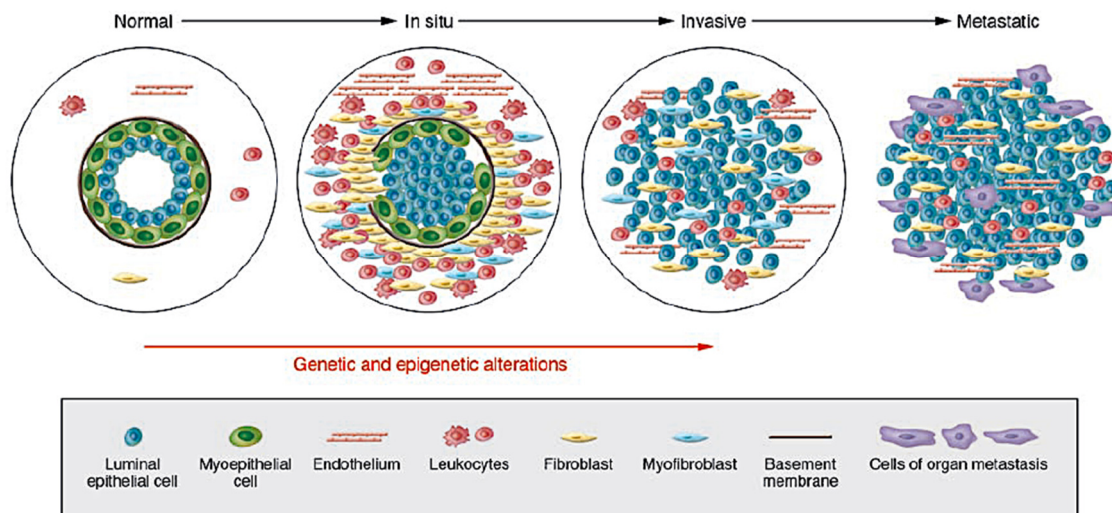


Figura 1.9. Progressione del tumore della mammella.

Le conoscenze sui meccanismi implicati nella progressione sono ancora lacunose: più che a proprietà intrinseche delle cellule, la progressione sembra essere dovuta a complesse interazioni tra gli epiteli neoplastici e il microambiente tumorale. Studi molecolari hanno dimostrato significative differenze nella qualità/quantità delle alterazioni cromosomiche presenti in DCIS di diverso grado: potrebbero quindi esistere nella oncogenesi mammaria numerosi e distinti *pathways* carcinogenici [24,51].

I dotti mammari sono normalmente costituiti da una membrana basale e uno strato di cellule mioepiteliali ed epiteliali lumenali, come si è detto. Le cellule che compongono lo stroma comprendono vari leucociti, fibroblasti, miofibroblasti e cellule endoteliali. Nel carcinoma *in situ* le cellule mioepiteliali sono alterate epigeneticamente e fenotipicamente e il loro numero diminuisce, potenzialmente a causa della degradazione della membrana basale. Allo stesso tempo, aumenta il numero di fibroblasti stromali, miofibroblasti, linfociti e cellule endoteliali. Nei carcinomi invasivi le cellule tumorali possono invadere i tessuti circostanti, causando la perdita delle cellule mioepiteliali e della membrana basale. Possono anche migrare in organi distanti, determinando infine metastasi [49,52].

1.3.3. Diagnosi e stadiazione

La diagnosi del cancro al seno alle prime fasi è uno degli aspetti più importanti per l'efficacia del suo trattamento. Le tecniche di *imaging* sono i principali approcci diagnostici, dalle quali ottenere informazioni preziose [53]. Il cancro al seno invasivo viene comunemente rilevato tramite mammografia di *screening*. Le caratteristiche da prendere in considerazione per un tumore maligno includono la massa, la distorsione architettonica, l'asimmetria e la presenza di microcalcificazioni; la loro presenza richiede

ulteriori *work-up* con mammografia diagnostica, ecografia, *core needle biopsy* (citologico) e talvolta risonanza magnetica nucleare. Per pazienti che si presentano con una massa palpabile, la valutazione consiste in una “tripla valutazione” di tipo clinico, *imaging* (mammografia diagnostica ed ecografia) e citologico. La stadiazione sistemica per la valutazione di metastasi a distanza è indicata solo per le pazienti con malattia al terzo stadio clinico [21].

Alla diagnosi segue lo *staging*, cioè la determinazione dello stadio della malattia in base allo stato di avanzamento. Ciò aiuta i medici a scegliere il trattamento più appropriato e a ipotizzare una prognosi [3]. La stadiazione clinica del tumore alla mammella è identica tra i vari sottotipi di cancro, e si basa sulle indicazioni fornite dall’*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e dall’*International Union for Cancer Control* (UICC) e riportate in Tabella 1.1 [15].

<i>Tabella 1.1. Stadiazione del cancro della mammella.</i>	
Stadi	Definizione
<i>Stadio 0</i>	Carcinoma duttale <i>in situ</i>
<i>Stadio IA</i>	Tumore invasivo primario con dimensione ≤ 20 mm No coinvolgimento linfonodale
<i>Stadio IB</i>	Micrometastasi nodali ($> 0,2$ mm, < 2 mm) con o senza tumore primario di ≤ 20 mm
<i>Stadio IIA</i>	Metastasi in linfonodi mobili omolaterali di livello I, II con ≤ 20 mm di tumore primario; oppure tumore > 20 mm ma ≤ 50 mm senza coinvolgimento linfonodale
<i>Stadio IIB</i>	Metastasi in linfonodi mobili omolaterali di livello I, II con > 20 mm ma ≤ 50 mm di tumore; oppure tumore > 50 mm senza coinvolgimento linfonodale
<i>Stadio IIIA</i>	Metastasi in linfonodi mobili omolaterali di livello I, II con > 50 mm di tumore; oppure tumore primario di qualsiasi dimensione con metastasi in linfonodi fissi omolaterali di livello I, II o interni
<i>Stadio IIIB</i>	Tumore primario con invasione alla parete toracica e/o alla pelle
<i>Stadio IIIC</i>	Tumore primario di qualsiasi dimensione con metastasi in linfonodi sovra clavicolari o omolaterali di livello III; oppure con metastasi in linfonodi omolaterali di livello I, II e interni
<i>Stadio IV</i>	Qualsiasi caso con metastasi in organi distanti

1.3.4. Altri parametri prognostici

Ulteriori test permettono al patologo di prevedere il comportamento tumorale e l'efficacia dei trattamenti [24,54]. Di seguito vengono elencati i principali:

- Grado tumorale: un patologo, esaminando le cellule tumorali al microscopio, può determinarne il loro grado di anomalia rispetto alle cellule mammarie sane. Esistono tre gradi di carcinoma duttale invasivo: basso o di grado 1 (G1); moderato o di grado 2 (G2); e alto o grado 3 (G3). Il *grading* combina in un unico *score* i punteggi assegnati

a tre variabili cito-istologiche: formazione di tubuli, polimorfismo nucleare e indice mitotico. La sopravvivenza delle pazienti con carcinoma G1 è significativamente migliore rispetto a quella dei G2/G3.

- Margini chirurgici: in seguito a trattamento chirurgico, il medico deve valutare che i margini siano puliti. Per alcuni patologi il margine può considerarsi negativo con almeno 2 mm di tessuto normale oltre il bordo del tessuto canceroso, per altri meno o più.
- Invasione linfovaskolare
- Recettori ormonali: i recettori steroidei (ER, PR) sono espressi dal normale epitelio della mammella e dal 70-80% dei carcinomi. Le pazienti con tumori ER-/PR- hanno scarse probabilità di rispondere a terapie ormonali con antiestrogeni, come il tamoxifene e gli inibitori dell'aromatasi. Al contrario, tumori ER+/PR+ hanno elevata probabilità di risposta con impatto prognostico significativamente positivo.
- HER2: la sovraespressione e/o l'amplificazione genetica di HER2 è presente nel 15-20% dei carcinomi. Il gene HER2 produce una proteina nota come recettore HER2. I recettori HER2 si trovano sulla superficie delle cellule e sono implicati nel trasmettere segnali di crescita cellulare. Di per sé, l'espressione di HER2 è un fattore prognostico

negativo, tuttavia le neoplasie HER2-positive possono giovare di terapia mirata anti-HER2, che blocca la capacità delle cellule tumorali di ricevere segnali di crescita.

- **Ki-67**: proteina nucleare non istonica presente in tutte le fasi attive del ciclo cellulare (eccetto la fase G₀), è un marker di proliferazione ed aiuta a determinare l'aggressività del tumore. La sua valutazione immunohistochimica viene espressa come percentuale di cellule positive rispetto al numero totale di cellule maligne identificate: > 15% di nuclei positivi indica espressione di Ki-67 alta, maggiore aggressività e diffusione del tumore; < 15% di nuclei positivi indica espressione di Ki-67 bassa. È anche uno dei parametri più discussi per le decisioni terapeutiche [55,56].

1.3.5. Trattamento e tassi di sopravvivenza

Il trattamento del cancro al seno comprende sia trattamenti locali (chirurgia, radioterapia o entrambi) e/o terapia sistemica.

Per quanto riguarda l'intervento chirurgico, a seconda dello stadio e del tipo di tumore, si può attuare una rimozione completa della mammella (mastectomia) o una chirurgia conservativa (lumpectomia, resezione parziale o quadrantectomia), purché il tessuto rimosso nell'operazione abbia margini

puliti. Inoltre, per valutare l'estensione della malattia tumorale e definire opportunamente il programma terapeutico più adatto, è fondamentale verificare chirurgicamente lo stato dei linfonodi del cavo ascellare omolaterale, con la biopsia del linfonodo sentinella, il più vicino al tumore, o la dissezione (svuotamento) ascellare [57,58].

La radioterapia coinvolge l'uso di raggi gamma o raggi x ad alta energia per colpire il tumore o il luogo in cui esso era presente. Viene solitamente effettuata dopo la chirurgia ed è parte integrante di una terapia conservativa del seno [59]. A causa dei suoi potenziali effetti negativi a lungo termine, è indicata solo in pazienti ad alto rischio di recidiva locale [60,61].

L'obiettivo generale della terapia sistemica è eliminare la malattia metastatica microscopica. Può essere somministrata prima dell'intervento (neoadiuvante) o postoperatoria (adiuvante) e comprende diverse strategie. La chemioterapia prevede l'uso di una classe di farmaci citotossici che uccidono le cellule cancerose sensibili. La sua efficacia è correlata con il tasso di proliferazione tumorale. La terapia endocrina agisce bloccando l'interazione di ormoni, estrogeni e progesterone, con i recettori tumorali, mentre le terapie biologiche mirano specificatamente ai componenti molecolari delle cellule tumorali, usando per esempio farmaci che “prendono di mira” specifiche molecole

interne ai *pathways* oncogeni o aberrazioni genetiche, con il vantaggio di minori effetti collaterali [18,21, 57,62].

L'*American Cancer Society* raggruppa informazioni nel database SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*), gestito dal *National Cancer Institute* (NCI), per fornire statistiche di sopravvivenza per diversi tipi di cancro. Il database SEER tiene traccia dei tassi di sopravvivenza relativa a 5 anni per il cancro al seno negli Stati Uniti, in base alla diffusione del cancro. Il database, tuttavia, non raggruppa i tumori per stadi AJCC TNM, ma in: localizzato, senza segni di diffusione fuori dal seno; regionale, con diffusione alle strutture vicine o ai linfonodi; e distante, con metastasi. Il tasso di sopravvivenza relativo a 5 anni per i tumori localizzati è del 99%, regionali 86%, distanti del 26%. In media il tasso di sopravvivenza è del 90% a 5 anni [63]. Ma i registri indicano solo l'incidenza e la mortalità, ma non la data di ricaduta: non sappiamo quindi quante donne vivono con una malattia metastatica e quante sono le sopravvissute senza cancro. Senza considerare la difficoltà delle sopravvissute nei paesi a basso e medio reddito [64], e gli effetti avversi a lunghi periodi dopo il trattamento del cancro, con disfunzioni ossee, fisiche e mentali [65].

1.4. Triple Negative Breast Cancer

La prima menzione su PubMed di Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) risale all'ottobre del 2005 [66]; ora questo termine appare in più di 16 mila pubblicazioni. Ciò riflette il crescente riconoscimento dell'importanza di questo tipo di cancro e la necessità di migliorare la conoscenza scientifica a questo riguardo.

Il tumore triplo negativo della mammella comprende un gruppo eterogeneo di neoplasie, tutte caratterizzate dalla mancanza di espressione del recettore dell'estrogeno (ER), del recettore del progesterone (PR) e del recettore epidermico umano 2 (HER2) [67]. I TNBC rappresentano il 12-17% di tutti i carcinomi mammari, sono maggiormente diagnosticati in donne giovani con età inferiore ai 40 anni e nelle donne afroamericane [68]. Da un punto di vista genetico, meno del 20% delle pazienti presentano una mutazione al gene del cancro della mammella (BRCA), in particolare al BRCA1 [69]. Da un punto di vista patologico, i TNBC sono di solito ad alto grado istologico, classificabili come carcinomi duttali infiltranti [70]. A causa dell'intrinseco comportamento clinico aggressivo del tumore e della mancanza di target terapeutici efficaci, le pazienti hanno di solito una prognosi infausta [71]. Per questo motivo, si prevede il trattamento routinario con la chemioterapia convenzionale per tutte le pazienti, sia che esse presentino stadi avanzati o

precoci di tale patologia. Nonostante la chemioterapia migliori significativamente i risultati clinici di pazienti TNBC, i tassi di recidiva restano comunque elevati e in alcuni casi si osserva lo sviluppo di chemioresistenza [72,73]. Fra i TNBC, si osserva una grande differenza in termini di risposta ai trattamenti [74,75], che può essere in parte spiegata da una rilevante eterogeneità interpaziente, sia in termini di dati istologici che per quanto riguarda le diverse tecnologie “omiche” [76].

1.4.1. Classificazioni

Da un punto di vista istologico, la maggior parte dei TNBC (95%) sono classificati come carcinomi mammari invasivi di nessun tipo specifico (o alternativamente, come carcinomi duttali invasivi), privi di caratteristiche istologiche distintive, ma sono stati descritti differenti sottotipi (Figura 1.10a). Il carcinoma midollare è caratterizzato da un’elevata infiltrazione linfoplasmocitaria e buon esito rispetto agli altri sottotipi [77].

Anche il carcinoma cistico adenoide, il carcinoma adenosquamoso e i carcinomi metaplastici *spindle-cell* sono meno aggressivi, capaci di recidive locali. Il carcinoma cistico adenoide è un sottogruppo genomicamente distinto caratterizzato da una bassa frequenza di aberrazioni nel numero di copie e una

traslocazione cromosomica caratteristica, t(6;9), che porta alla fusione del gene MYB-NFIB, presente nel 90% circa dei casi di questo sottotipo di TNBC [72].

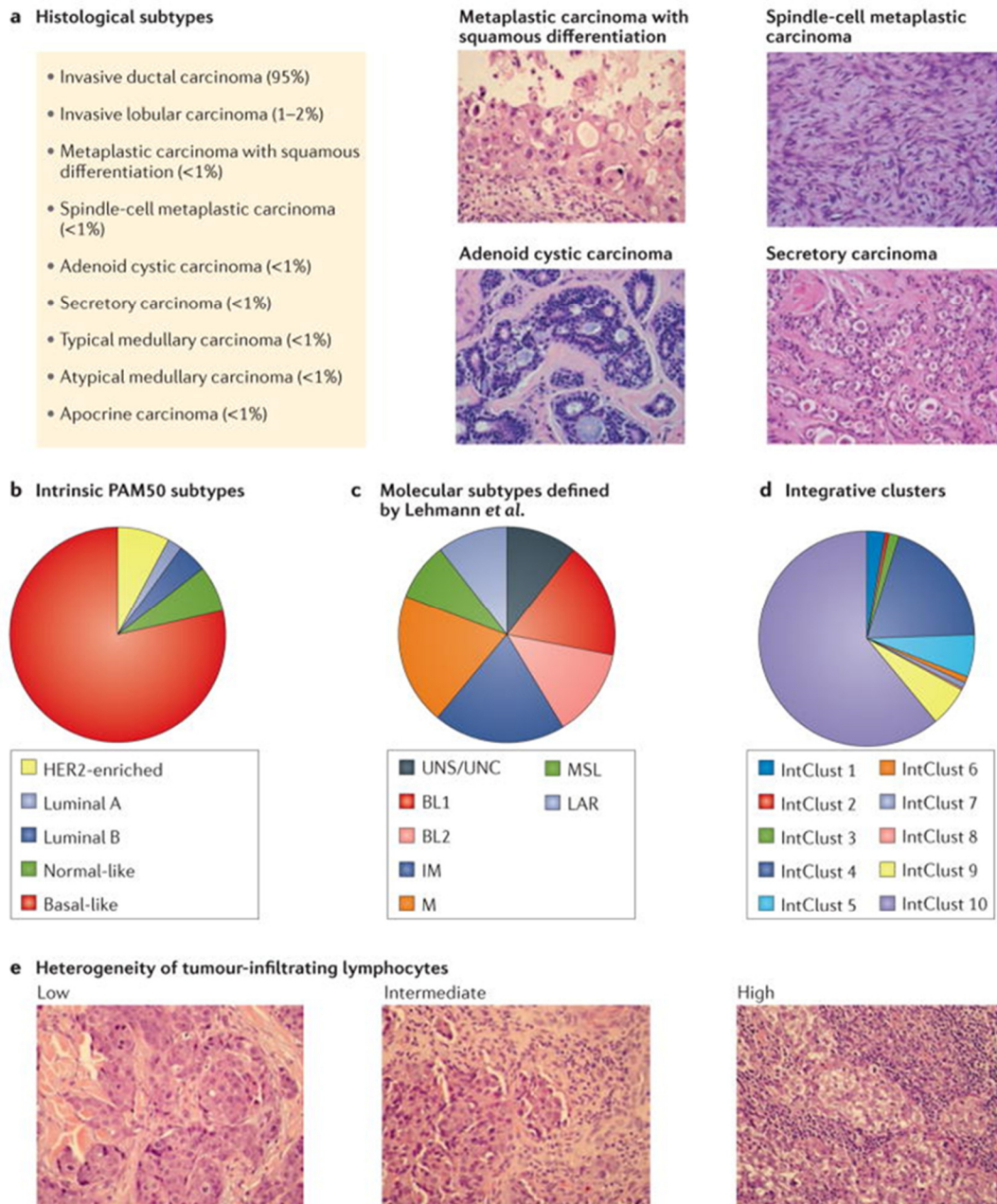


Figura 10. Differenti approcci per studiare l'eterogeneità dei TNBC.

Il fenotipo clinico TNBC di solito consiste nel sottotipo molecolare *basal-like*, sebbene i TNBC e i tumori al seno di tipo basale non siano sinonimi, anzi vi è una sostanziale eterogeneità all'interno dei TNBC. Il *landscape* molecolare di TNBC è complesso e ancora oggi non pienamente compreso, in gran parte a causa dell'eterogeneità delle sue caratteristiche genetiche e cliniche. Un ampio studio di 172 campioni di TNBC ha rivelato che solo il 71% è assegnabile al sottotipo basale [78].

Studi fondamentali sull'espressione genica hanno identificato differenti sottotipi "intrinseci" di cancro alla mammella (*basal-like*, ricco di HER2, luminale A e B e *normal-like*), che corrispondono ampiamente, ma non si sovrappongono, ai gruppi definiti dai recettori ormonali e dallo stato di HER2. In questi studi si conferma quanto il tumore *basal-like* sia un'entità patologica unica, nonostante abbia lo stesso tessuto di origine dei tumori luminali o ER positivi [25,26,79]. Il termine *basal-like* perché le cellule tumorali esprimono geni caratteristici delle cellule basali/mioepiteliali, come accennato precedentemente.

Confrontando i sottotipi di TNBC con i sottotipi molecolari intrinseci definiti dall'espressione dell'mRNA di 50 geni (PAM50) (classificazione descritta sopra), la maggior parte dei TNBC rientrano nei *basal-like* (>80%) (Figura 1.10b) [80].

Uno studio di sequenziamento a singola cellula ha cercato di sezionare l'eterogeneità specifica di questo tumore: sulla base dei profili di espressione genica sono stati identificati sei sottotipi di TNBC, che includono due sottogruppi correlati al *basal-like* (*basal-like* 1 e 2, BL1 e BL2), due sottogruppi correlati al mesenchimale (M e *mesenchymal stem-like*, MSL), un sottogruppo immunomodulatorio (IM) e un gruppo dei recettori degli androgeni luminali (LAR) (Figura 1.10c) [81].

In un altro studio, sono stati definiti 10 clusters integrativi (IntClust) di cancro al seno sulla base di dati genomici e trascrittomici. I *basal-like* sono distribuiti eterogeneamente tra i diversi gruppi, con IntClust 4 e 10 che rappresentano l'80% di essi, nonostante l'eterogeneità: i tumori classificati come IntClust 4 hanno un'ampia infiltrazione linfocitaria, poche aberrazioni del numero di copie e prognosi favorevole. I sottotipi IntClust 10 hanno ampia instabilità genomica e frequenti aberrazioni cromosomiche (Figura 1.10d) [82].

1.4.2. Decorso e sopravvivenza

Come detto, i TNBC sono solitamente ad alto grado e invasivi. Uno studio ha infatti messo in evidenza quanto i tumori *basal-like* abbiano più probabilità di essere linfonodo-negativi [83].

I TNBC sono caratterizzati da una relazione insolitamente attenuata tra la dimensione del tumore primario e la probabilità di sopravvivenza [71]. La loro crescita rapida e la ricorrenza frequente in giovani donne può rendere il rilevamento tramite mammografia difficile: spesso infatti viene rilevato in fase avanzata già durante lo *screening*. Inoltre, la probabilità e il luogo di metastatizzazione varia rispetto alle altre forme di tumore (Figura 1.11) [67].

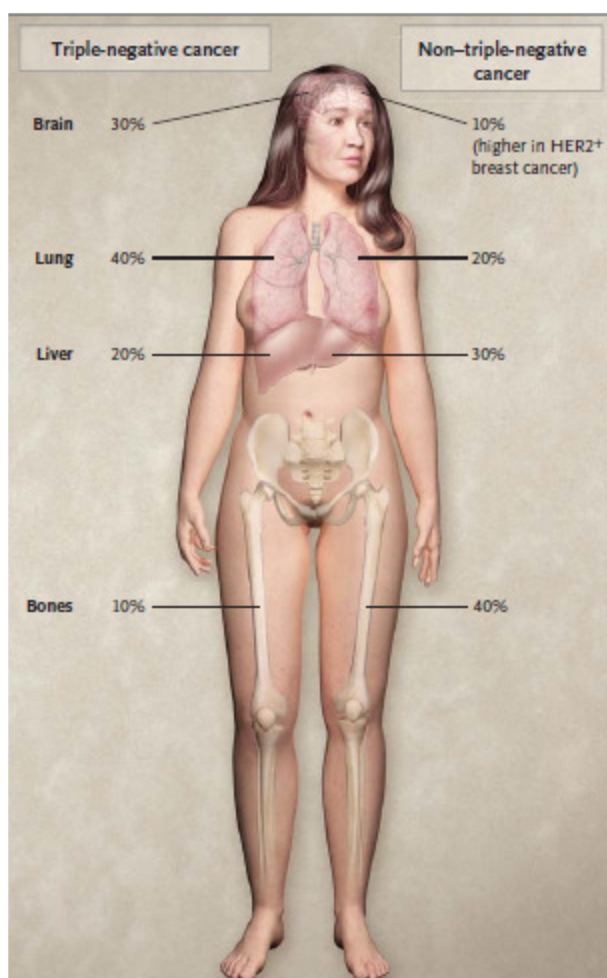


Figura 1.11. Siti di prima recidiva a distanza in TNBC, comparati con non-TNBC.

La forma della curva di sopravvivenza per pazienti con TNBC cala drasticamente durante i primi 3-5 anni dopo la diagnosi, ma la ricaduta lontana dopo questo tempo è molto meno comune. Dopo 10 anni, le recidive sono più probabili in pazienti ER positivi (Figura 1.12) [67,84].

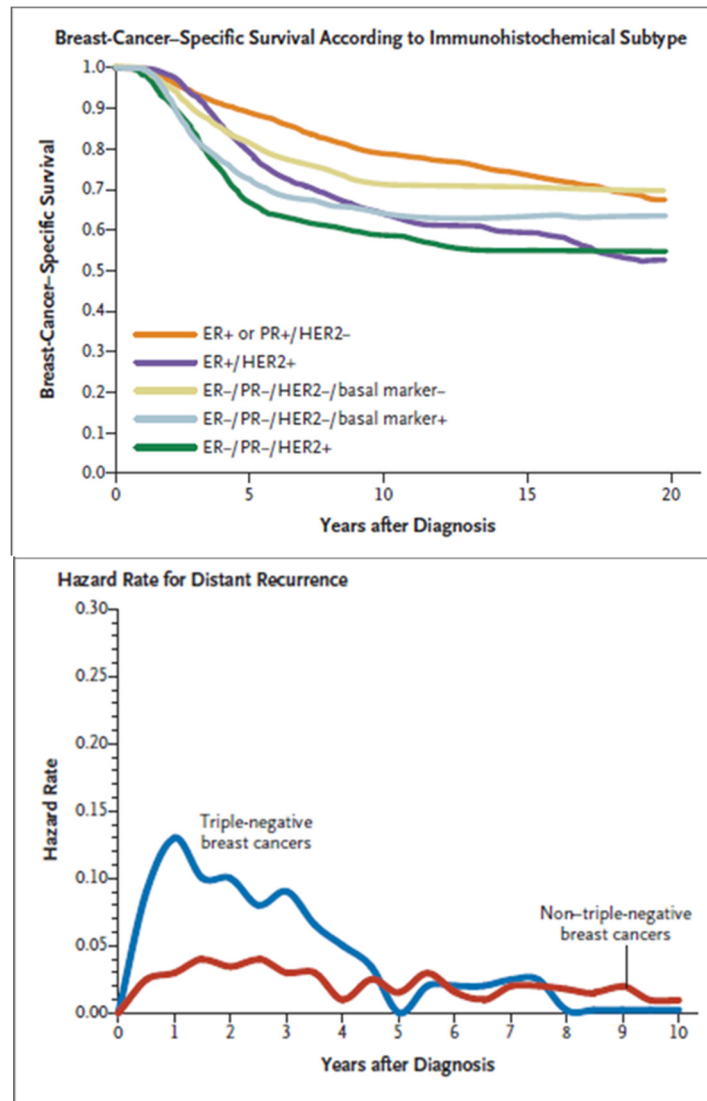


Figura 1.12. Tasso di sopravvivenza secondo il sottotipo immunoistochimico (grafico superiore) e rischio per recidive a distanza di TNBC e non-TNBC (grafico inferiore).

1.4.3. Diagnosi e trattamento

Ad oggi, la diagnosi di TNBC viene eseguita mediante valutazione immunohistochimica di ER e PR, e di HER2 mediante ibridazione fluorescente *in situ* [85]. È fondamentale una valutazione accurata per evitare false diagnosi di malattie ER-negative e/o HER2-negative in pazienti che trarrebbero beneficio da terapie endocrine e/o farmaci *HER2-targeted*. Tuttavia, nonostante gli sforzi compiuti per ottimizzare e standardizzare questi metodi, ci sono ancora discrepanze nei risultati delle diagnosi, principalmente a causa dell'eterogeneità multilivello dei TNBC (molecolare, istologica e clinica) [72].

È altrettanto importante delineare il ruolo di singoli geni o *pathways*, che possono essere dei *targets* potenzialmente perseguibili con il trattamento. Ad esempio, i fattori di trascrizione *forkhead box O* (FOXO) hanno un ruolo riconosciuto nello sviluppo e nella progressione del tumore. In particolare, FOXOa è altamente espresso nei tumori TNBC con caratteristiche cliniche e patologiche negative [86]. Il 40% dei TNBC mostra una sovraespressione dell'oncogene MYC, noto per mettere in relazione la riprogrammazione metabolica a tumorigenesi e disregolare diversi *pathways* [87].

Analizzando l'intero genoma, i tumori TNBC portano in media 1,68 mutazioni somatiche per Mb di regioni codificanti e circa 60 mutazioni

somatiche per tumore, anche se il carico di mutazione non è uniforme: alcuni TNBC possono avere un elevato carico, superiore a 4,68 mutazioni somatiche per Mb [72]. Sembra che i TNBC abbiano frequenti aberrazioni multiple del numero di copie di geni che portano alterazioni in più *pathways*, come mutazione/delezione di BRCA1/2 nel *pathway* di riparo del DNA: potenziali nuovi target per terapie mirate personalizzate [88,89].

Inoltre, l'adattabilità metabolica dei TNBC causa interazioni con il tessuto stromale che circonda il tumore, necessarie per la vitalità e la crescita del tumore stesso. È stato dimostrato che il cancro al seno vive nel microambiente tumorale, con cellule tumorali e una quantità significativa di stroma e cellule circostanti fisiopatologicamente alterate. Questi componenti, tra i quali i fibroblasti riprogrammati e l'ECM alterata, ostacolano una efficace risposta antitumorale, promuovendo la progressione del cancro e le metastasi.

Il TBCN è considerato caratterizzato da un microambiente unico e distinto da quello degli altri sottotipi. Queste alterazioni uniche, come l'alto numero di linfociti infiltranti (Figura 1.10e), la migrazione dei fibroblasti, un pronunciato effetto nella crescita e aggressione degli adipociti, potrebbero servire come fattori prognostici promettenti di esito clinico o potenziali target terapeutici [90].

1.5. Spettroscopia FTIR Imaging

La Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FTIR) è una tecnica vibrazionale classica, che non provoca la frammentazione della molecola e non danneggia quindi il campione. Si basa sull'analisi dell'interazione fra la radiazione elettromagnetica e la materia; nel caso della radiazione infrarossa, questa provoca transizioni vibrazionali nei legami chimici e quindi la spettroscopia FTIR permette di caratterizzare i gruppi funzionali presenti in una molecola sulla base delle vibrazioni dei legami presenti nei diversi gruppi funzionali. È una tecnica analitica molto versatile, in quanto permette di studiare una grande varietà di materiali, nei diversi stati fisici, fornendo informazioni quali e quantitative a livello di struttura e composizione macromolecolare.

1.5.1. Principi teorici

La radiazione elettromagnetica rappresenta il mezzo più efficace per trasferire una quantità discreta di energia alla materia. Maxwell l'ha definita come un flusso di particelle, fotoni, con massa m , che viaggiano nel vuoto alla velocità della luce c (3.00×10^8 m/s), secondo un moto ondulatorio. È costituita da una componente elettrica e una magnetica, per la precisione da un campo elettrico

E ed un campo magnetico M , oscillanti, cioè variabili nel tempo, perpendicolari e in fase fra loro (Figura 1.13). Per questo alla radiazione elettromagnetica viene attribuito un comportamento dualistico onda/particella.

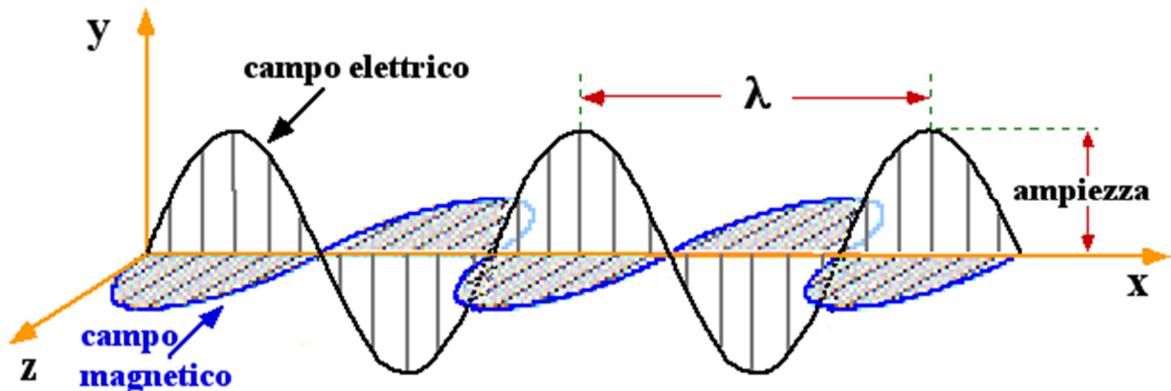


Figura 1.13. Rappresentazione ondulatoria della radiazione elettromagnetica.

La distanza nella direzione di propagazione corrispondente ad una completa oscillazione, in altri termini la distanza tra due massimi o due minimi consecutivi, prende il nome di lunghezza d'onda (λ , cm^{-1}) della radiazione elettromagnetica, mentre l'ampiezza è l'altezza dell'onda rispetto all'asse di propagazione. Il numero di volte che la lunghezza d'onda si ripete nell'unità di tempo è la frequenza (ν , Hertz o s^{-1}), che misura il numero di oscillazioni al secondo. La relazione che intercorre tra la velocità della luce, la lunghezza d'onda e la frequenza è:

$$\nu = c/\lambda$$

Nella spettroscopia IR, rispetto alla frequenza di oscillazione, si preferisce utilizzare il numero d'onda $\bar{\nu}$, definito come l'inverso della lunghezza d'onda ed espresso in cm^{-1} :

$$\bar{\nu} = \nu/c = 1/\lambda$$

La natura elettromagnetica dei fotoni è identica, ma possono avere frequenza diversa. Le radiazioni elettromagnetiche hanno nomi diversi a seconda dell'intervallo di frequenza e quindi di lunghezze d'onda che coprono. Lo spettro elettromagnetico comprende tutti i vari tipi di radiazione elettromagnetica, dai raggi cosmici alle onde radio. L'occhio umano è sensibile solo ad una piccola porzione di radiazioni, approssimativamente quelle comprese tra 380 e 780 nm (Figura 1.14).

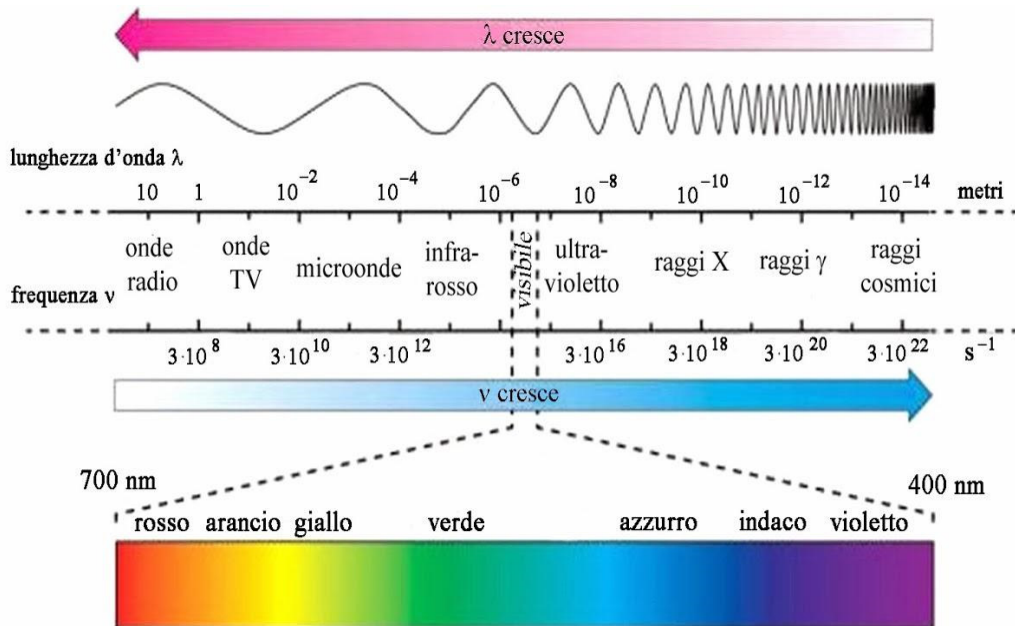
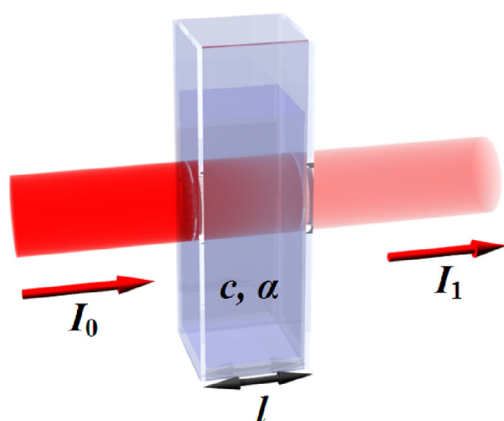


Figura 1.14. Spettro della radiazione elettromagnetica.

Quando un fotone con un determinato valore di frequenza interagisce con la materia può determinare sia uno *scattering*, cioè una variazione nella direzione di propagazione della radiazione stessa, sia una transizione tra i livelli energetici degli stati fondamentale ed eccitato del campione in esame. Gli atomi e le molecole esistono in un numero definito di stati o livelli energetici, ed il passaggio da un livello all'altro richiede l'assorbimento o l'emissione di energia, di fotoni. Le differenze energetiche che caratterizzano le transizioni elettroniche, vibrazionali e rotazionali dipendono dalle caratteristiche chimico-fisiche strutturali della materia e le radiazioni possono essere sfruttate per il riconoscimento molecolare e di gruppi funzionali.

La spettroscopia FTIR è definita una spettroscopia di assorbimento in quanto i legami chimici presenti nel campione assorbono determinati numeri d'onda, dando luogo a transizioni vibrazionali. Tale assorbimento è funzione della concentrazione della specie in esame C , del cammino ottico l (distanza che il raggio percorre all'interno del campione) e del coefficiente di estinzione molare del campione ε (legge di Lambert-Beer, Figura 1.15):

$$A = \varepsilon C l$$



Assorbanza

$$A = \text{Log } 1/T$$

Trasmittanza

$$T = I_1 / I_0$$

Figura 1.15. Assorbimento della radiazione elettromagnetica da parte di un campione.

Definizione di Assorbanza e Trasmittanza.

Nella spettroscopia IR, ogni legame ha un suo coefficiente di estinzione molare ϵ che dipende dalla polarità del legame stesso: maggiore è la polarità del legame, maggiore è il suo assorbimento.

Per spiegare le transizioni vibrazionali che sono alla base della spettroscopia FTIR si può prendere in esame una molecola biatomica. In questo caso è possibile un solo movimento vibrazionale lungo l'asse di legame ("stiramento" o "*stretching*"), determinando l'aumento o la diminuzione della lunghezza del legame stesso. Sulla base della meccanica classica, possiamo considerare infatti una molecola biatomica come un oscillatore armonico che segue la legge di Hooke, in cui k è la costante di forza della molla (nel nostro caso il legame) e x lo spostamento (Figura 1.16).

Quando un sistema di questo tipo è allontanato dalla situazione di equilibrio si crea una forza di richiamo:

$$F = - k x$$

Secondo tale teoria l'energia varia esponenzialmente e senza limiti come conseguenza dell'allungamento o accorciamento del legame. Ma ciò non descrive in maniera corretta la realtà fisica: fra due atomi esistono diverse forze attrattive e repulsive che originano dal legame chimico. Il bilanciamento di questi due tipi di forza risulta in una distanza ben precisa, la distanza di legame, per cui il sistema si trova in un minimo di energia potenziale. Il legame vibra, si allunga e si accorcia continuamente attorno a questa posizione di equilibrio. Le molecole seguono le leggi della quantomeccanica, per le quali solo determinati valori di energia vibrazionale e quindi di frequenza sono permessi. L'energia vibrazionale è quantizzata ed esistono dei livelli energetici vibrazionali, equidistanti fra loro (Figura 1.16).

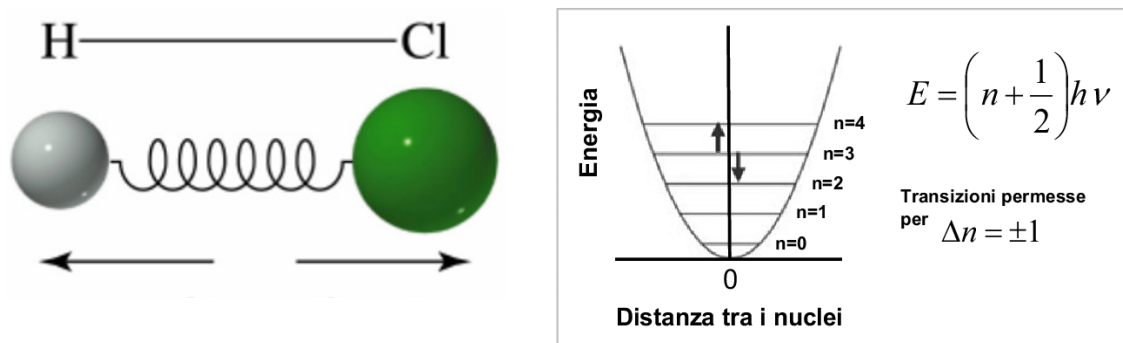


Figura 1.16. Molecola biatomica ed energia vibrazionale.

Le vibrazioni di molecole costituite da più di due atomi possono essere classificate in base al tipo di movimento che determinano: si parla di *stretching* quando la vibrazione avviene lungo l'asse di legame e determina esclusivamente un allungamento o accorciamento del legame stesso, si parla di *bending* quando la vibrazione implica una variazione nell'angolo di legame. I moti vibrazionali sono sei in totale [91] (Figura 1.17):

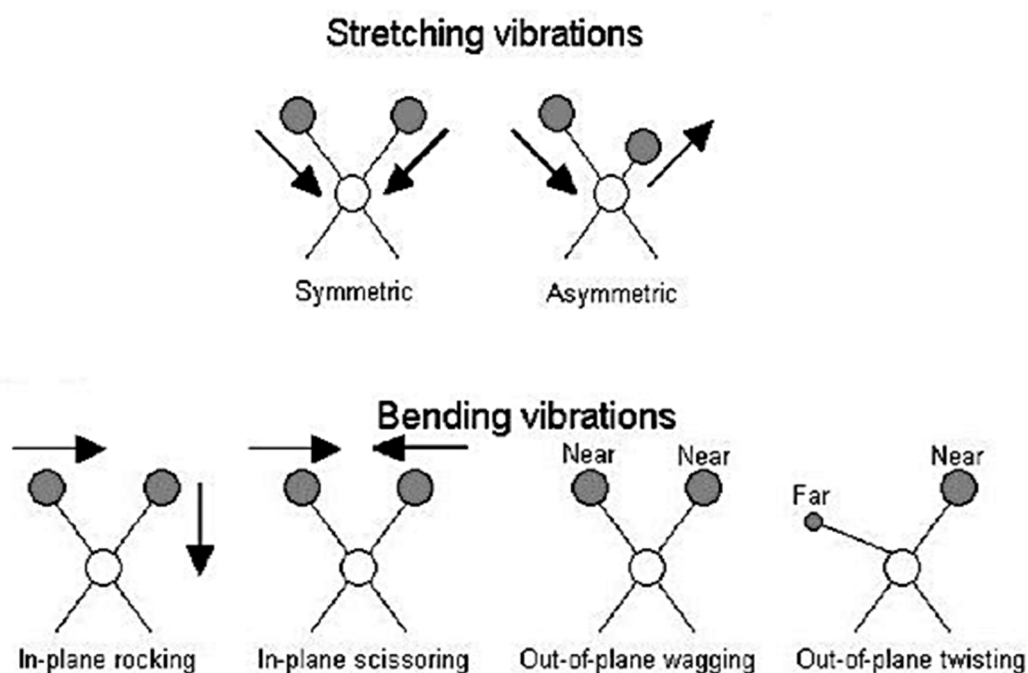


Figura 1.17. Vibrazioni di stretching e bending dei legami chimici.

In realtà non tutte le vibrazioni prevedibili danno necessariamente luogo a bande di assorbimento nello spettro IR. Le regole di selezione che si ricavano da trattazioni quantomeccaniche, rappresentano i limiti entro i quali si può avere una banda in seguito all'interazione tra radiazione e materia. Innanzitutto, la transizione può avvenire solo se l'energia posseduta dalla radiazione è esattamente uguale alla separazione fra due livelli vibrazionali della molecola (*prima regola di selezione*).

Inoltre, l'assorbimento di questa energia deve generare dei cambiamenti nel momento dipolare della molecola (*seconda regola di selezione*).

1.5.2. Regioni dello spettro IR

La radiazione infrarossa diagnostica per i legami chimici va da 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , e viene definita come medio infrarosso (Mid IR o MIR). Lo spettro IR si presenta come un diagramma che riporta l'assorbanza (A, che ha il vantaggio di essere una funzione lineare sia della concentrazione della sostanza che assorbe la radiazione che del cammino che il raggio percorre all'interno del campione) o la trasmittanza (T) in funzione del numero d'onda ($\bar{\nu}$). L'insieme di tutte le frequenze assorbite dal campione rappresenta lo spettro infrarosso della sostanza stessa.

Lo spettro IR viene diviso in due zone (Figura 1.18):

- la zona delle alte frequenze, tra 4000 e 1500 cm^{-1} , detta regione dei gruppi funzionali, contiene le vibrazioni di gruppo attribuibili solo ai singoli gruppi funzionali, indipendentemente dalla molecola nella quale si trovano;
- la zona delle medie/basse frequenze, tra 1500 e 400 cm^{-1} , detta regione dell'impronta digitale (*finger print region*) perché contiene le vibrazioni di scheletro in cui tutti gli atomi subiscono spostamenti di uguale entità. Ogni molecola in questa zona ha uno spettro tipico e le bande sono molto sensibili a piccole variazioni strutturali.

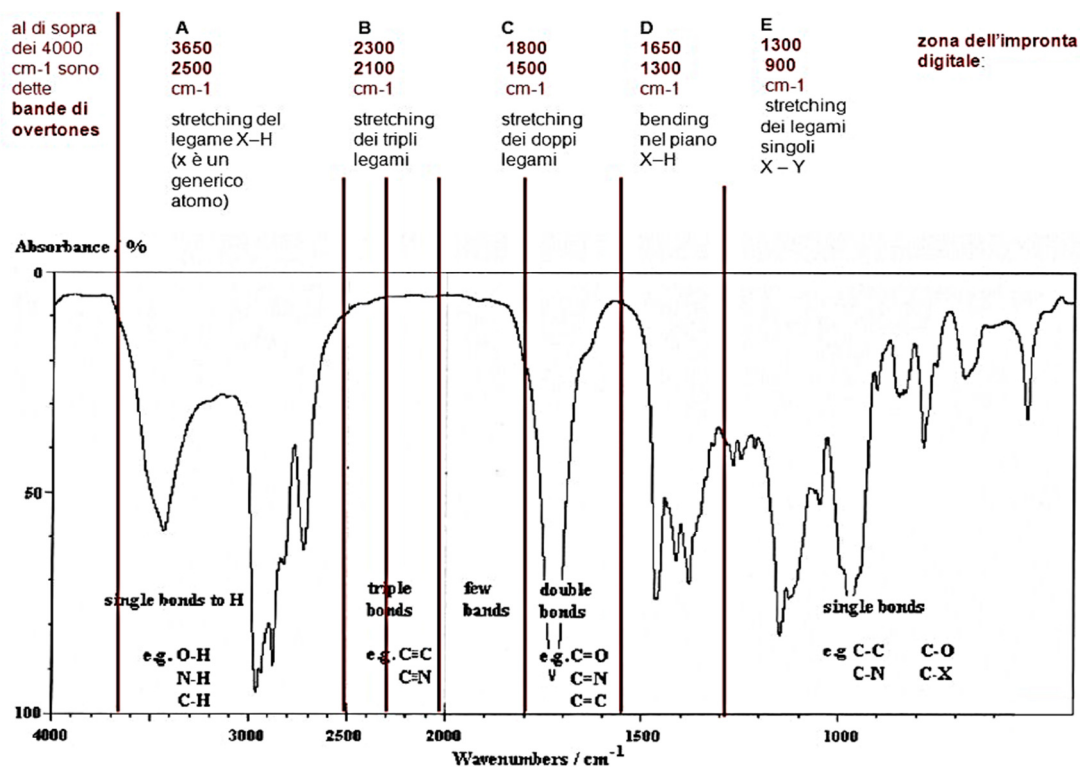


Figura 1.18. Regioni dello spettro IR e principali bande di assorbimento.

L'analisi dello spettro IR di un composto permette di individuare tutti i gruppi funzionali in esso contenuti. La posizione, l'intensità e la forma delle bande IR dipendono da diversi fattori, fra cui il valore del momento dipolare del legame a cui si riferisce, lo stato fisico del campione, la presenza di legami idrogeno e la presenza di bande vicine non risolte (bande convolute) [92,93].

1.5.3. Analisi vibrazionale di sistemi biologici

La tecnica FTIR-HSI combina la spettroscopia FTIR e la microscopia ottica con strumenti chemometrici, che comprendono l'analisi gerarchica dei cluster (HCA, *Hierarchical Cluster Analysis*), l'analisi delle componenti principali (PCA, *Principal Component Analysis*), la regressione ai minimi quadrati parziali (PLSR *Partial Least Square Regression*) e l'analisi discriminante (PLS-DA, *Discriminant Analysis*). Permette di eseguire l'analisi *imaging* iperspettrale di mappe IR di materiali biologici (cellule e tessuti) con una elevata risoluzione spaziale (ca. 2,56 μm). È possibile ottenere grazie a questa tecnica informazioni strutturali sul campione come la composizione e la distribuzione delle principali biomolecole (lipidi, proteine, acidi nucleici, carboidrati, composti fosforilati, ecc.).

Lo spettro di un tessuto o di un gruppo di cellule contiene infatti tutte le vibrazioni delle varie biomolecole presenti nel campione, ognuna con bande rappresentative in intervalli spettrali diversi (Figura 1.19). Valutando la composizione biochimica del campione, è possibile individuare eventuali modificazioni dovute a patologie.

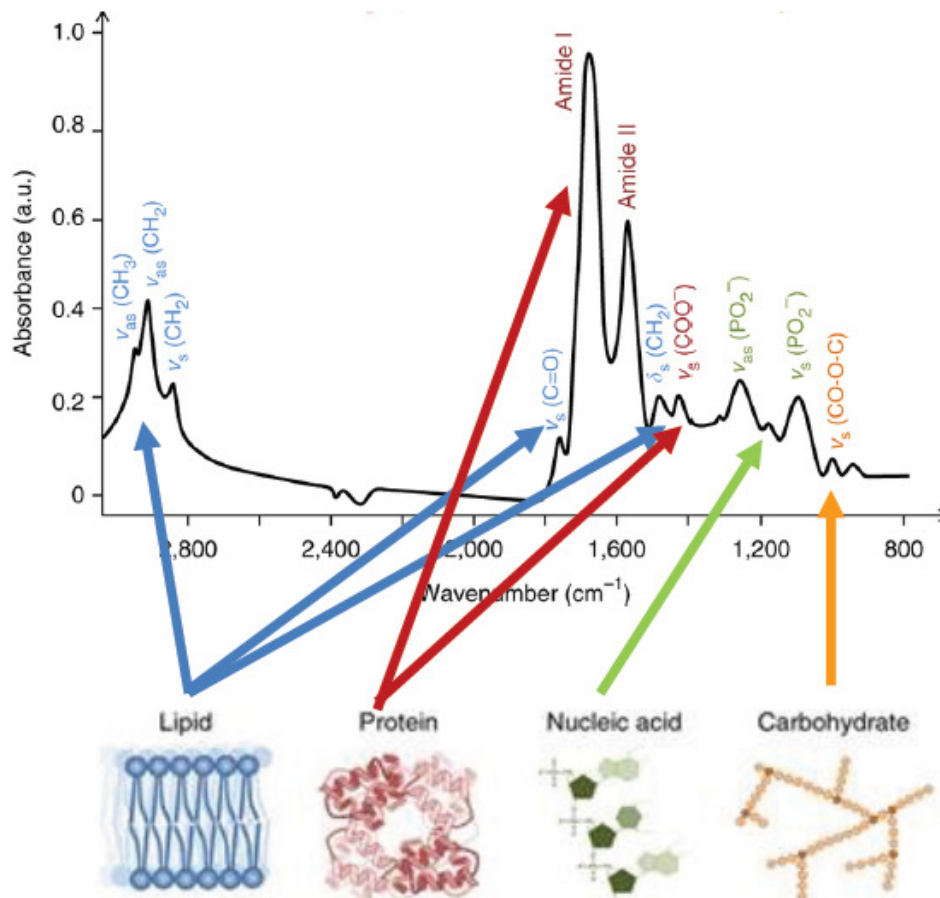


Figura 1.19. Spettro IR di campioni biologici (cellule e tessuti).

Dall'analisi di specifici picchi IR è possibile stabilire il grado di saturazione e insaturazione delle catene alchiliche dei lipidi e valutarne la lunghezza. Gli acidi nucleici hanno diverse zone di assorbimento, dovute alla presenza di diversi gruppi funzionali (basi azotate, ribosio o desossiribosio, gruppi fosfato). Le principali bande IR delle proteine invece riguardano il legame peptidico. Le bande Ammide I (1650 cm^{-1}) e Ammide II (1567 cm^{-1}) sono due bande convolute che forniscono importanti informazioni sulla struttura

secondaria delle proteine. Infatti, tramite specifici software di *peak fitting* è possibile ricavare per queste due bande le sottobande componenti, attribuibili alle strutture β turn, β sheets, α elica, 3-turn e random coil (Figura 1.20). L'Amide I è dovuta allo *stretching* del C=O (80%) e del C-N (10%) e al *bending* del legame N-H (10%). L'Amide II è dovuta principalmente al *bending* del legame N-H (60%) e allo *stretching* del C-N (40%) [94].

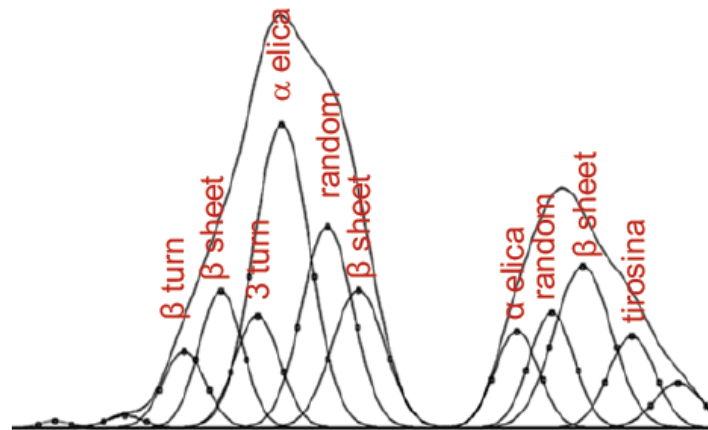


Figura 1.20. Peak fitting delle bande Amide I e II delle proteine. Assegnazione della struttura secondaria.

1.6. La spettroscopia infrarossa applicata a problematiche oncologiche

La spettroscopia FTIR Imaging è una tecnica vibrazionale *label-free*, veloce e affidabile, che offre il vantaggio di richiedere un minimo impatto sulla routine

dell'anatomia patologica. È ampiamente applicata in biomedicina per analizzare la composizione macromolecolare di cellule e tessuti [95]. La spettroscopia FTIR Imaging abbinata a specifiche tecniche di analisi multivariata (*Hyper Spectral Imaging analysis*, FTIR-HSI) è stata sfruttata con successo negli ultimi anni in combinazione con l'analisi istologica standard di sezioni bioptiche/chirurgiche, fornendo una correlazione fra i dati morfologici e la composizione macromolecolare del campione in esame [96]. L'analisi FTIR-HSI fornisce l'impronta macromolecolare del campione, che può essere direttamente correlata con specifici processi biologici, con lo stato metabolico, la risposta ad un determinato farmaco o la diagnosi di differenti patologie. Il successo della spettroscopia FTIR Imaging in campo biomedico e la sua potenzialità di integrarsi con le procedure diagnostiche convenzionali sono un punto di forza che rendono questa tecnica estremamente affidabile e riproducibile, in grado di fornire con una sola misura e in tempi brevi, un'ampia gamma di informazioni biomolecolari [97].

L'analisi FTIR-HSI mostra un forte potenziale nella diagnosi oncologica [95], sia permettendo di individuare lievi modificazioni a livello molecolare, prima che ogni cambiamento morfologico possa essere rilevato dalle osservazioni convenzionali [95,98,99], che fornendo preziose informazioni sugli effetti dei trattamenti farmacologici/radiologici [97,100].

Esistono in letteratura diversi studi in cui la spettroscopia FTIR Imaging è applicata allo studio dei tumori della mammella, con lo scopo di migliorarne la complessa classificazione, identificare biomarker per una diagnosi precoce e ricercare nuovi approcci terapeutici. Ad esempio, è stato possibile classificare numerose neoplasie maligne in base al *grading*; sfruttando le differenze spettrali nelle bande Ammide I e II delle proteine [101], le variazioni nelle vibrazioni di *stretching* dei gruppi metile e metilene delle proteine e dei fosfolipidi [102], e la presenza di bande del collagene tipiche [103]. In particolare, è stata notata una progressione continua nelle caratteristiche spettrali del collagene man mano che ci si allontana dal tumore, modificazioni associabili alla crescita della massa tumorale [103]. A dimostrazione dell'importanza del microambiente nello sviluppo tumorale, si è studiata anche la stimolazione dei fibroblasti, che risulta diversa in base al sottotipo di cancro [104].

L'analisi FTIR viene applicata non solo a campioni biotici e a cellule, ma anche a siero e sangue; questa applicazione potrebbe essere nel futuro estremamente interessante e rivoluzionaria per una diagnosi veloce e semplice da effettuare in laboratorio, che assicuri allo stesso tempo elevate percentuali di sensibilità e specificità [105-107]. Altra applicazione rivoluzionaria

riguarda l'utilizzo di una sonda ATR-FTIR per la ricerca, diagnosi e *follow-up in situ* del tessuto cancerogeno [108].

Come già accennato, la spettroscopia vibrazionale sembra essere uno strumento promettente per monitorare l'efficacia della chemioterapia nel corso del trattamento stesso, grande sfida da sempre per questo approccio terapeutico. Varie ricerche hanno dimostrato differenze spettrali significative tra il tessuto mammario sano, canceroso e post-chemioterapia. Inoltre, i risultati ottenuti per tre casi di pazienti hanno rivelato che lo spettro IR del tessuto mammario post-chemioterapia somiglia molto a quello del tessuto mammario sano quando la chemioterapia è efficace (cioè si ottiene una buona risposta terapeutica), o a quello del tessuto mammario canceroso quando la chemioterapia è inefficace [109]. La spettroscopia FTIR è stata anche applicata con successo allo studio delle interazioni farmaco-cellula e per quanto riguarda il processo del *drug delivery* [100,110].

Tramite la spettroscopia FTIR, è stato possibile identificare i biomarcatori spettrali della progressione del cancro sul modello 3D in vitro delle metastasi ossee del cancro al seno [111] e evidenziare come i linfonodi interessati presentassero una somiglianza chimica con il tessuto tumorale [112].

La tecnica FTIR ha fornito inoltre risultati interessanti nella caratterizzazione di tumori più specifici e meno conosciuti, come i IBC (*inflammatory breast cancer*), i non-IBC [113,114], e i TNBC [100,115], sui quali c'è ancora tanto da studiare.

2. SCOPO DELLA TESI

Durante la mia tesi di laurea mi sono occupata dell'analisi FTIR Imaging di campioni di tessuto con diagnosi di Carcinoma Invasivo Duttale (IDC) con classificazione fenotipica di Triplo Negativo (TNBC), al fine di: (1) effettuare una caratterizzazione spettrale del tessuto tumorale e individuare specifici marker spettrali di IDC TNBC, e (2) valutare gli effetti provocati dalla massa tumorale sul microambiente circostante. A tale proposito, per ogni paziente sono stati isolati aree corrispondenti alla massa tumorale, epitelio ghiandolare sano, tessuto connettivo sano e adiacente al tumore, e le informazioni morfologiche derivanti dall'analisi istologica sono state correlate con la composizione macromolecolare ricavata dall'analisi FTIR Imaging.

Lo studio è stato condotto fino ad ora su N. 9 pazienti con diagnosi di IDC-TNBC con diversa prognosi ed età. Allo stato attuale deve essere considerato come uno studio preliminare in quanto, data la complessità della neoplasia in esame e la variabilità riscontrata tra le varie pazienti, sarà necessario implementare il numero dei casi per migliorare la statistica dei dati.

3. MATERIALI E METODI

In Figura 3.1 è riportato il disegno sperimentale del mio lavoro di tesi. Le fasi dello studio sono state le seguenti:

- 1- Raccolta dei campioni tramite resezione chirurgica
- 2- Preparazione dei campioni
- 3- Analisi istologica su sezioni colorate con Ematossilina Eosina (H&E)
- 4- Analisi FTIR Imaging tramite acquisizione di mappe IR su sezioni non colorate
- 5- *Hierarchical Cluster Analysis* delle mappe IR ed estrazione degli spettri IR dai cluster di interesse
- 6- Analisi Univariata dei dati spettrali

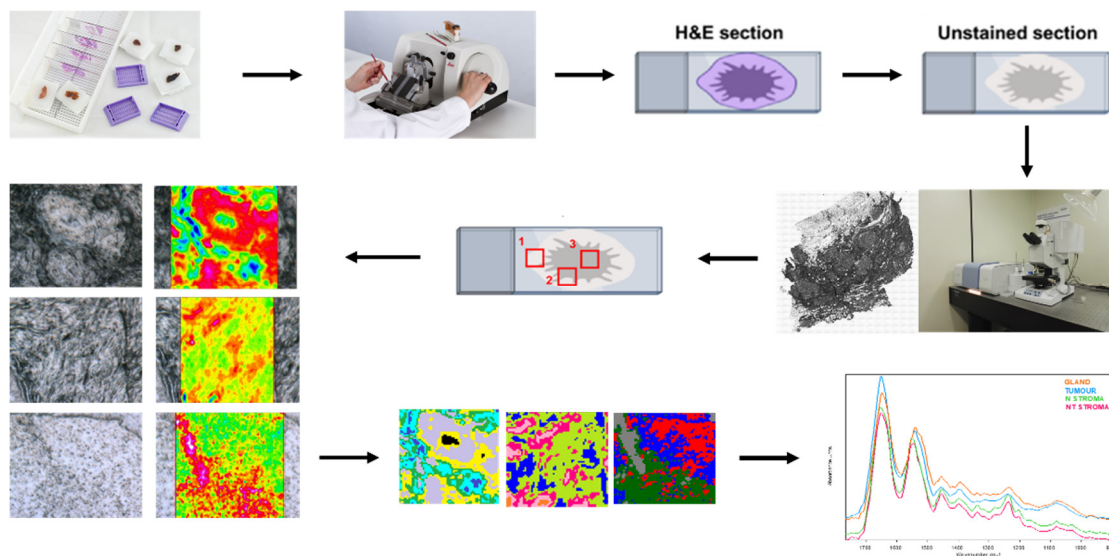


Figura 3.1. Disegno sperimentale e fasi dello studio.

3.1. Raccolta dei campioni di tessuto

Per questo studio, sono stati raccolti N. 9 campioni da pazienti con diagnosi di IDC-TNBC (periodo 2010-2015; età 64.4 ± 17.7 anni). Tutte le pazienti sono state sottoposte a resezione chirurgica del tessuto patologico e non erano state precedentemente sottoposte a nessun trattamento chemioterapico; tutte le pazienti inoltre hanno firmato un modulo di consenso informato per partecipare a questo studio.

Le pazienti e i campioni sono stati selezionati in base alle informazioni clinico-patologiche fornite dall'équipe clinica del Prof. Vincenzo Catalano

(oncologo, A.O. “Ospedali Riuniti Marche Nord”, Pesaro, Italia) e del Prof. Alfredo Santinelli (patologo, A.O. “Ospedali Riuniti Marche Nord”, Pesaro, Italia). In particolare, si è tenuto conto dei seguenti parametri:

- caratteristiche morfologiche, quali diametro massimo, invasione vascolare peritumorale, stato dei linfonodi, percentuale di Linfociti Infiltranti il Tumore (TIL);
- caratteristiche immunoistochimiche, quali espressione di Ki67, espressione in percentuale di PD-L1 (*Programmed Cell Death Ligand 1*) nelle cellule immunitarie (linfociti, macrofagi, cellule dendritiche, granulociti neutrofili);
- tipo di chemioterapia adiuvante effettuata;
- data, numero e sede della malattia metastatica alla recidiva;
- data di morte o ultima visita di controllo.

Ogni campione è stato suddiviso in due parti relative al tessuto sano (definito N) e alla massa tumorale (definito T), distanti fra loro ca. 1 cm; all'interno del campione T è stata inoltre individuata una zona di tessuto “sano” nelle immediate vicinanze del tumore (ca. 3 mm, definito NT). Pertanto, per ogni paziente sono state isolati 3 campioni denominati N, T e NT.

Tabella 3.1. Dati clinici delle varie pazienti

Codice Paziente	Età alla data di intervento	Tipo di intervento	Grading	Chemioterapia adiuvante	Progressione	Ki67
1	47 anni	mastectomia sx	3	AC --> TAXOL	1	40%
2	76 anni	QSC sx + linfadenopatia	3	AC --> TAXOL	0	30%
3	81 anni	mastectomia sx	3	CMF	1	38%
4	42 anni	Q dx + BLS	3	AC --> TAXOL	0	50%
5	37 anni	QSE sx + BLS	3	AC --> TAXOL	0	90%
6	67 anni	QII sx	3	AC --> TAXOL	0	70%
7	69 anni	mastectomia sx	3	AC --> TAXOL	0	30%
8	82 anni	Q dx + BLS	3	CMF	1	25%
9	79 anni	Q sx	3	AC (1) --> CMF	0	40%
QSC: Quadrante Superiore Centrale, Q: Quadrante, BLS: Biopsia del Linfonodo Sentinella, QSE: Quadrante Superiore Esterno, QII: Quadrante Inferiore Interno AC: chemioterapico, TAXOL: paclitaxel, CMF: Ciclofosfamide Metotrexato Fluorouracile 0: viva, 1: deceduta						

3.2. Preparazione dei campioni

I campioni di tessuto (circa 0,5x0,5x0,5 cm³) sono stati fissati con formalina tamponata al 10%, depositati in biocassette e sottoposti a disidratazione, attraverso il passaggio in soluzioni di alcol etilico a concentrazioni crescenti (rispettivamente al 70, 90, 95 e 100%). I campioni sono stati quindi trattati con xilene per 45 min, immersi in paraffina liquida per 4 h ed infine inclusi in paraffina solida. I campioni così preparati sono stati conservati a +4 °C fino al

momento del taglio, che è stato eseguito tramite un microtomo Leica, RM2125RTS, GmbH, Wetzlar, Germany. Per ogni campione sono state ottenute 10 sezioni dello spessore di 5 μm , che sono state depositate alternativamente su vetrino da microscopio per la successiva analisi istologica e su supporti ottici in Fluoruro di Calcio CaF_2 , per l'analisi FTIR Imaging.

3.3. Analisi istologica

Le sezioni depositate su vetrino da microscopio sono state colorate con ematossilina ed eosina (H&E), tramite coloratore LEICA ST5020. Le sezioni sono state quindi disidratate con xilene e ricoperte con vetrino copri-oggetto tramite una resina sintetica *Safe mount* (Bio-Optica). I vetrini sono stati lasciati ad asciugare a temperatura ambiente e osservati al microscopio ottico a trasmissione Zeiss Axio Imager.A2 (Zeiss, Oberkochen, Germany). Le immagini sono state acquisite mediante fotocamera a colori ad alta risoluzione AxioCam 503 (Figura 3.2).

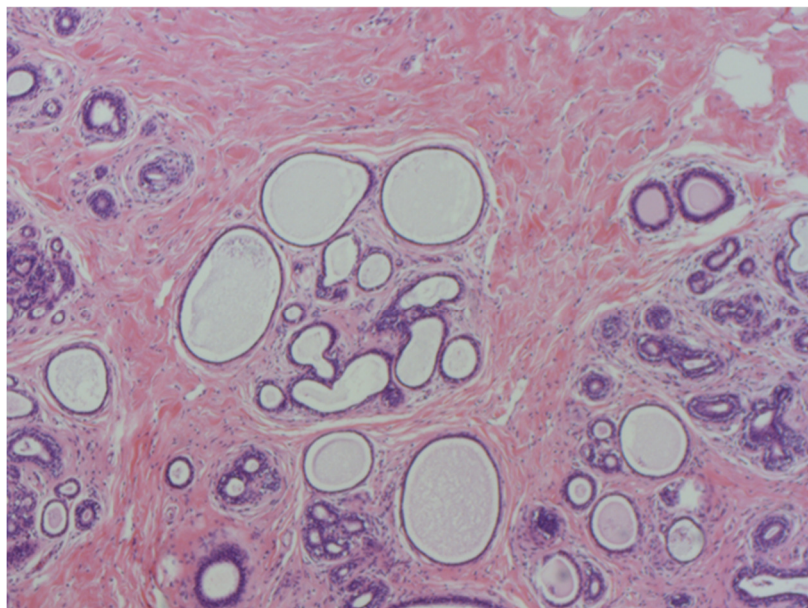


Figura 3.2. Esempio di una sezione istologica colorata con H&E.

3.4. Spettrometro FTIR

L'analisi FTIR Imaging è stata eseguita presso il Laboratorio ARI (*Advanced Research Instrumentation*) del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università Politecnica delle Marche (Ancona, Italia), tramite uno spettrometro FTIR Bruker dotato di interferometro INVENIO accoppiato con un microscopio Hyperion 3000 Vis-IR ed equipaggiato con un detector di tipo *Focal Plane Array* (FPA) per l'analisi *imaging* di cellule e tessuti (Bruker Optics, Ettlingen, Germany) (Figura 3.3).

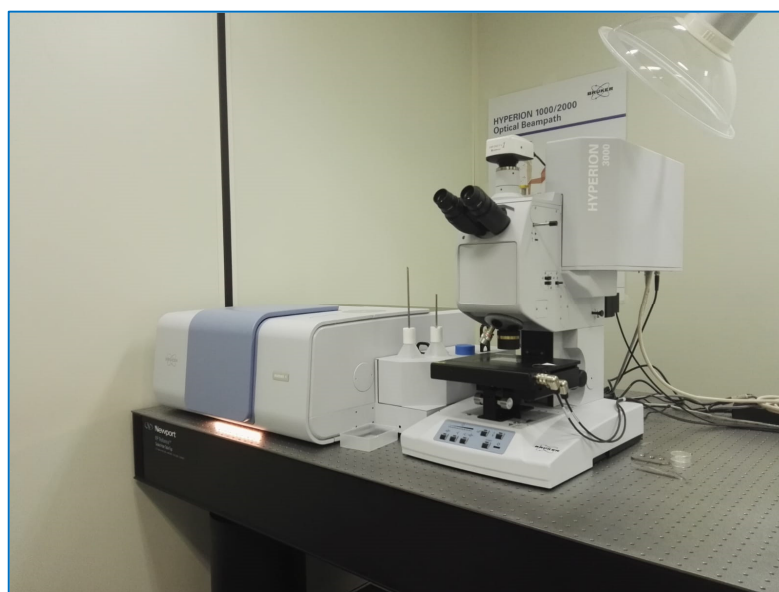
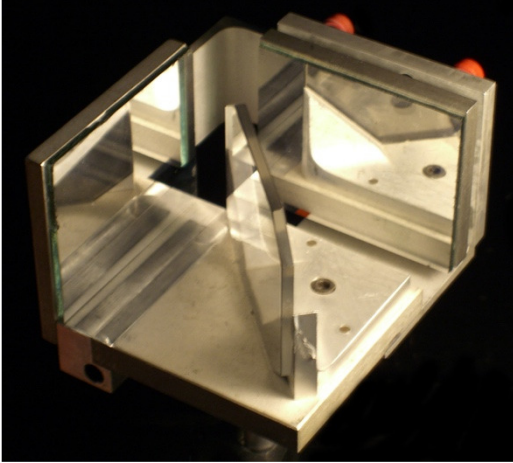


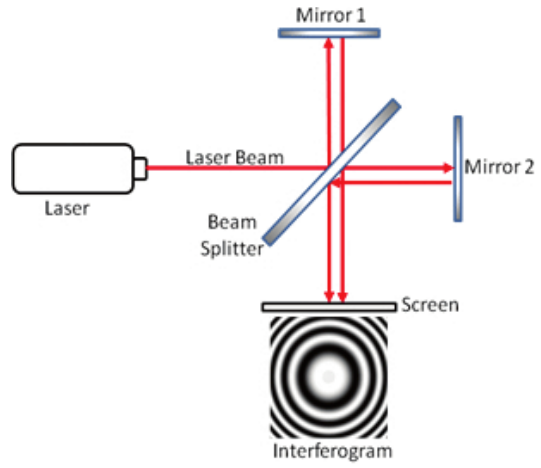
Figura 3.3. Spettrometro FTIR Bruker INVENIO accoppiato con un microscopio Hyperion 3000 Vis-IR ed equipaggiato con un detector Focal Plane Array (FPA) (Bruker Optics, Ettlingen, Germany).

L'interferometro INVENIO si basa sul modello dell'Interferometro di Michelson, un sistema di specchi che suddivide i raggi di luce in due raggi distinti che, dopo aver percorso cammini ottici diversi si ricombinano dando luogo a fenomeni di interferenza (Figura 3.4a,b). L'interazione dell'interferenza con il campione genera un interferogramma, che esprime l'intensità della radiazione assorbita in funzione del tempo (dominio dei tempi). L'interferogramma viene quindi convertito tramite la Trasformata di Fourier nello spettro di assorbimento, che esprime l'intensità della radiazione assorbita in funzione delle frequenze (dominio delle frequenze) (Figura 3.4c).

(a)



(b)



(c)

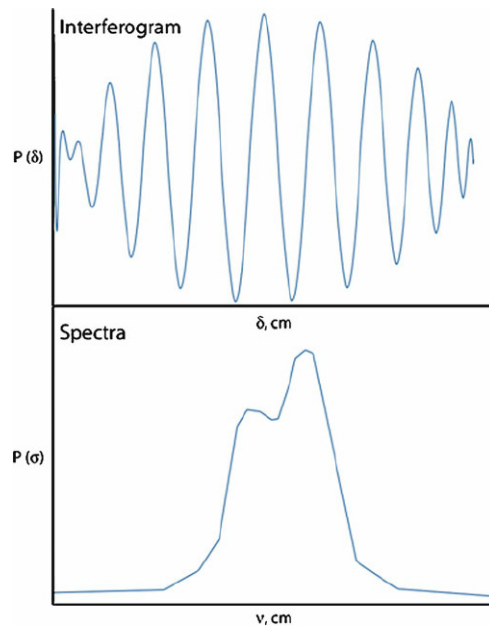


Figura 3.4. (a) Interferometro di Michelson. (b) Schema di funzionamento. (c) Interferogramma e Spettro IR.

3.5. Analisi FTIR-HSI

Prima di effettuare l'analisi FTIR Imaging, le sezioni depositate sui supporti ottici in Fluoruro di Calcio CaF₂, invisibili alla radiazione infrarossa, sono state sottoposte a sparaffinatura utilizzando il seguente protocollo:

- xilene per 5 minuti,
- xilene per 4 minuti,
- EtOH 100% per 3 minuti,
- EtOH 100% per 2 minuti.

Quindi, grazie alla telecamera (obiettivo 15x), è stata acquisita su ogni sezione, la corrispondente microfotografia (Figura 3.5a), in modo da individuare tramite il confronto con la adiacente sezione H&E su quali zone eseguire l'analisi FTIR Imaging (Fig. 3.5b). Su ognuna di queste zone, tramite l'utilizzo del detector FPA (*Focal Plane Array*) raffreddato ad azoto liquido, è stata acquisita la corrispondente mappa IR, in trasmissione e nel range spettrale 4000-800 cm⁻¹. Ogni mappa IR ha le dimensioni di 164x164 µm e contiene 4096 pixel/spettri (64x64 pixel/spettri), con risoluzione spaziale di 2,56 µm (al di sotto del limite della diffrazione). Per ogni mappa IR è stato acquisito, con gli stessi parametri e su una regione pulita del supporto ottico di CaF₂, lo spettro del *background* [96]. Le mappe IR "grezze" sono state

quindi sottoposte alla routine *Atmospheric Compensation* per eliminare il contributo dell'anidride carbonica atmosferica e il vapore acqueo e sottoposte a *Vector Normalization* nell'intero range spettrale per evitare artefatti dovuti a variazioni di spessore nella sezione (OPUS 7.5; Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany). Le mappe così ottenute, definite mappe IR preprocessate, sono state analizzate tramite analisi FTIR Imaging (Figura 3.5c) e *Hierarchical Cluster Analysis* (HCA) (Figura 3.5d), di seguito riportate.

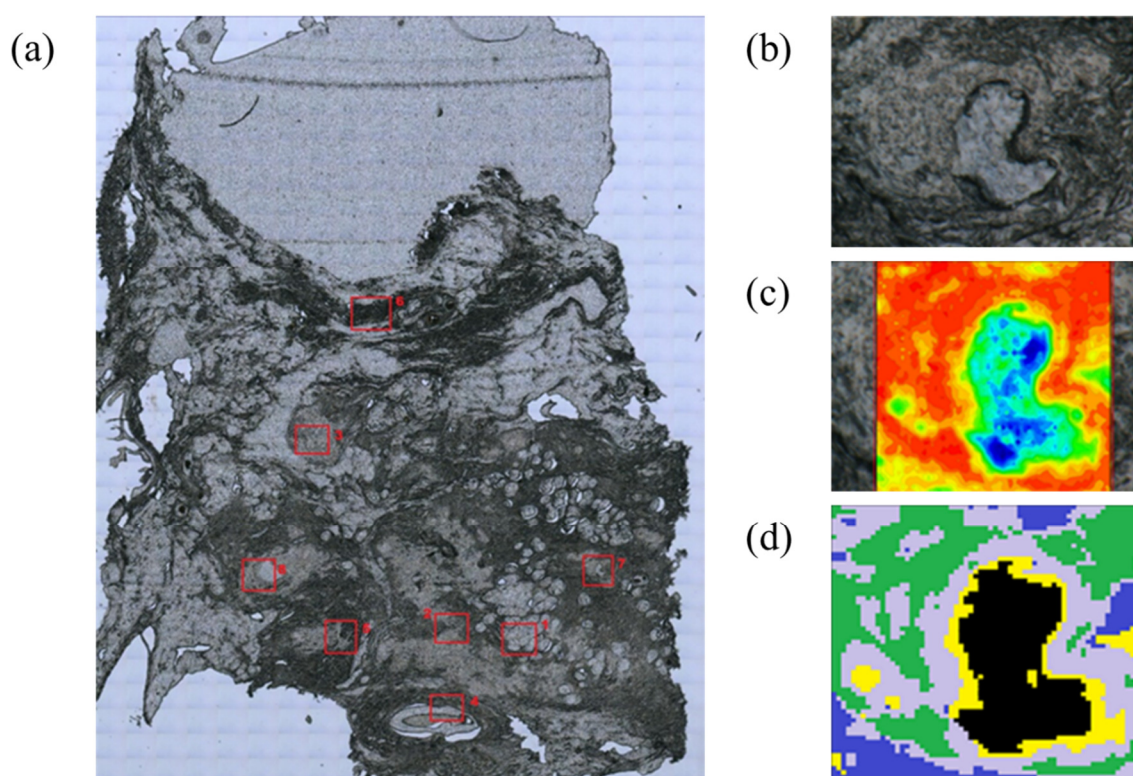


Figura 3.5. (a) Microfotografia della sezione di tessuto. (b) Microfotografia della zona mappata. (c) Mappa IR preprocessata e (d) immagine a falsi colori da HCA.

3.5.1. *Analisi FTIR Imaging*

In primo luogo, su ogni mappa IR preprocessata è stata valutata la distribuzione spaziale delle proteine totali e quindi del collagene, integrando le mappe nella regione spettrale 1720-1480 cm^{-1} , in cui sono presenti le bande Ammide I e II, relative ai modi vibrazionali del legame peptidico.

3.5.2. *Analisi multivariata*

Ogni mappa IR preprocessata è stata sottoposta all'analisi HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) per individuare i cluster spettrali corrispondenti alle diverse zone tissutali di interesse; ogni colore nell'immagine a falsi colori, corrisponde ad un cluster spettrale (stesso profilo spettrale) (software CytoSpec).

3.5.3. *Analisi univariata*

Dai cluster spettrali relativi alle zone tissutali di interesse, sono stati estratti gli spettri medi e lo spettro medio \pm spettro deviazione standard, che sono stati quindi sottoposti a procedura di *peak fitting* negli intervalli spettrali 1720-1480 cm^{-1} (relativo alla componente proteica) e 1350-900 cm^{-1} (relativo

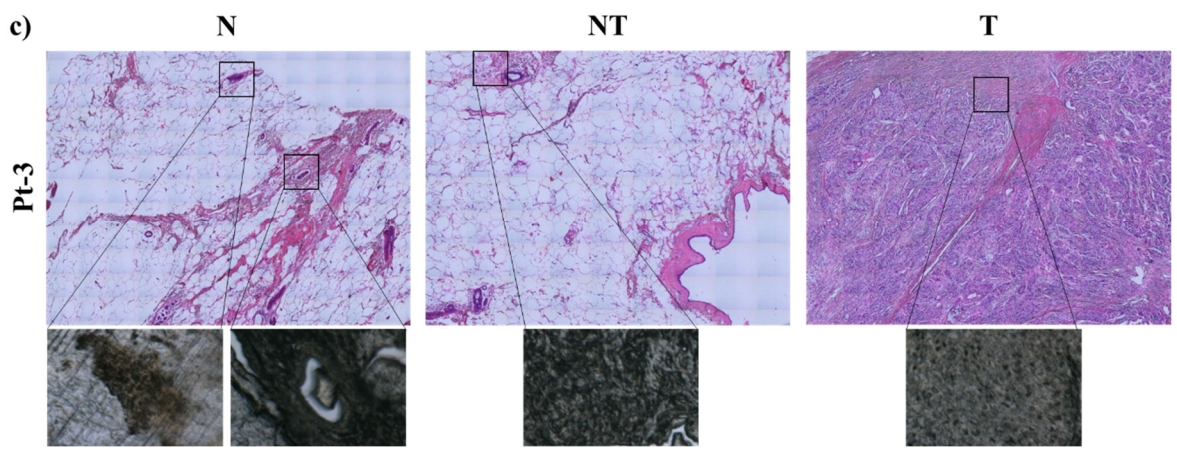
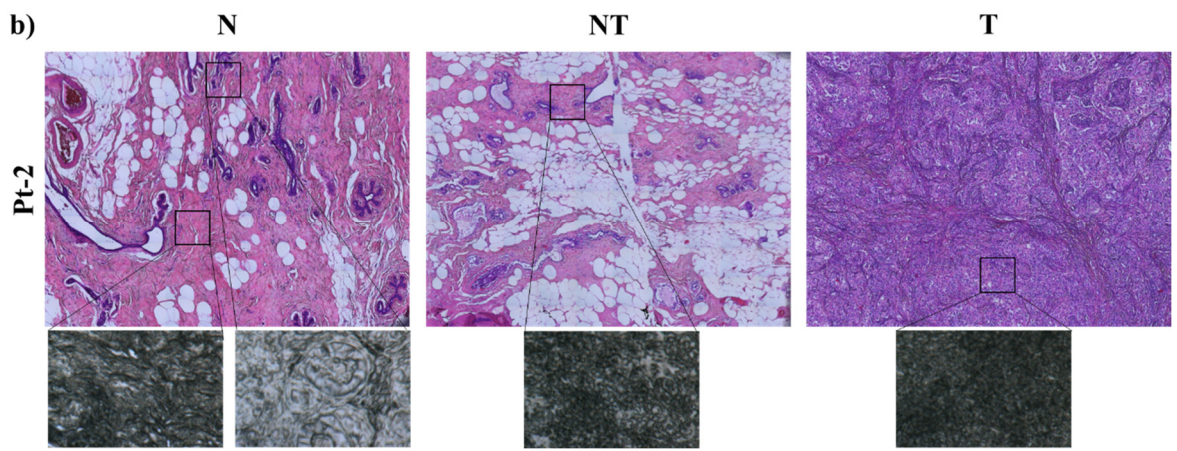
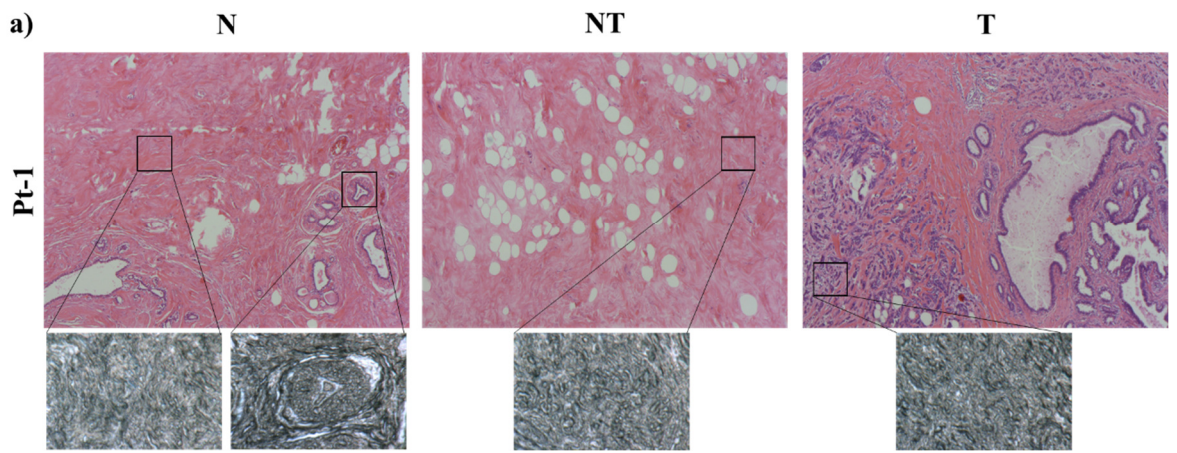
al collagene e agli acidi nucleici). Per ogni sottobanda componente è stata individuata la posizione (in termini di numeri d'onda) e l'area sottesa. Nella regione spettrale 1720-1480 cm^{-1} (relativa alla componente proteica), i seguenti rapporti di area delle bande sono stati quindi calcolati: BETA/AI, ALFA/AI, TURN/AI, RANDOM/AI [116,117]. Nella regione spettrale 1350-900 cm^{-1} (relativo al collagene e agli acidi nucleici), i seguenti rapporti di area delle bande sono stati quindi calcolati: 1342 (rapporto fra l'area della banda a 1342 cm^{-1} relativa al *wagging* dei gruppi CH_2 della prolina e l'area totale dell'intervallo spettrale 1350-900 cm^{-1}); 1173/1158 (rapporto fra l'area della banda a 1173 cm^{-1} relativa ai gruppi C-O-P e l'area della banda a 1158 cm^{-1} relativa ai gruppi C-O-H), 1079 (rapporto fra l'area della banda a 1079 cm^{-1} relativa ai gruppi fosfato e l'area totale dell'intervallo spettrale 1350-900 cm^{-1}), 962 (rapporto fra l'area della banda a 962 cm^{-1} relativa al DNA-A e l'area totale dell'intervallo spettrale 1350-900 cm^{-1}) e 934 (rapporto fra l'area della banda a 934 cm^{-1} relativa al DNA-Z e l'area totale dell'intervallo spettrale 1350-900 cm^{-1}) [96,118-123].

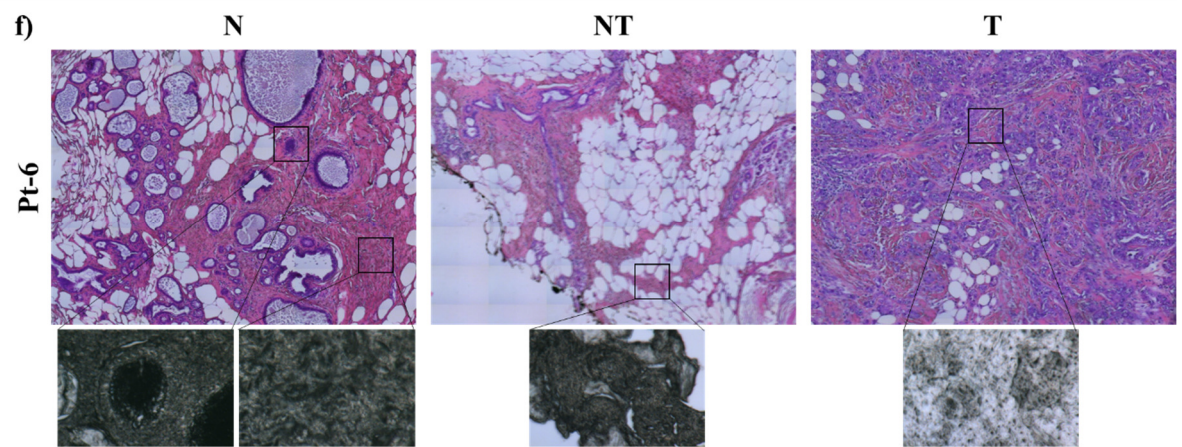
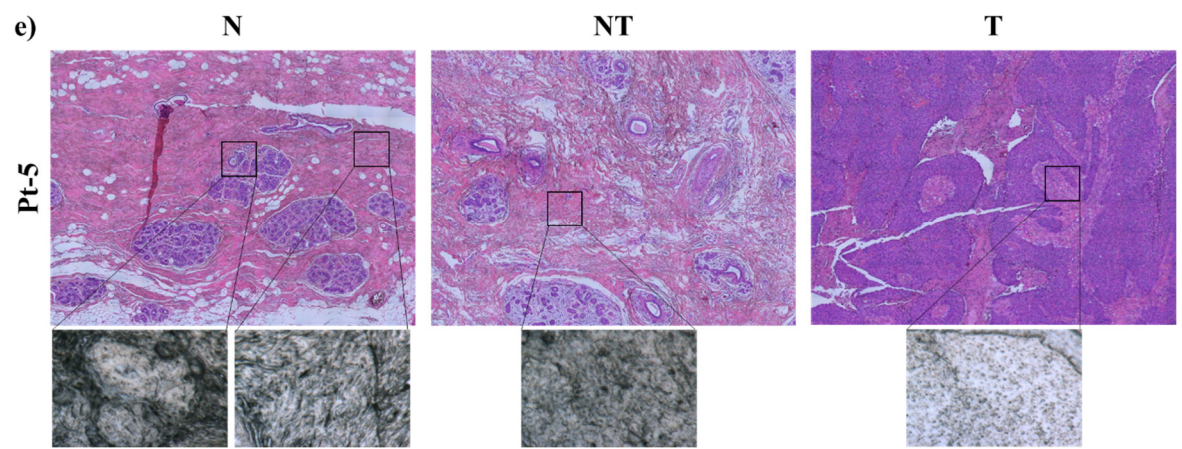
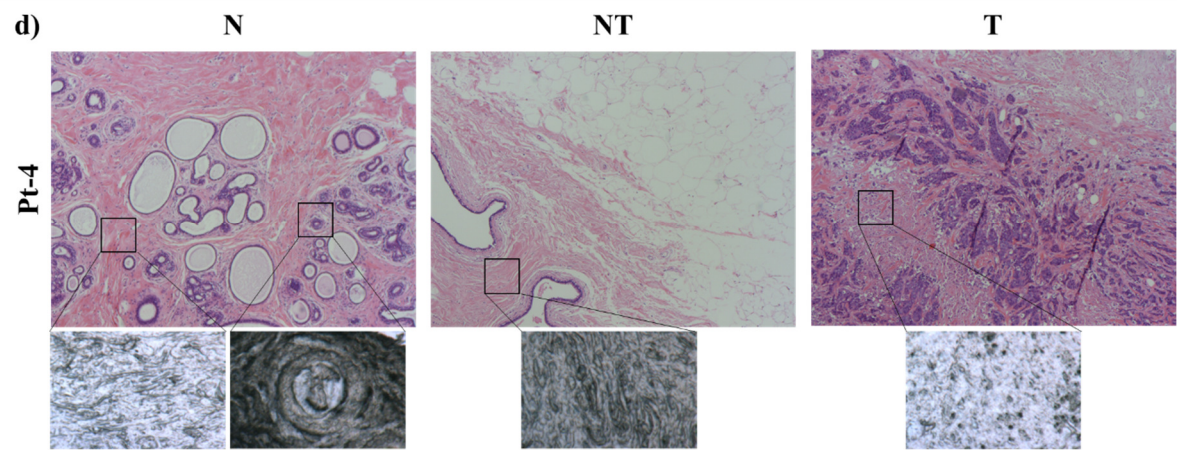
L'analisi statistica dei dati spettrali è stata condotta utilizzando il software Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Tutti i dati sono riportati come $\text{media} \pm \text{DS}$. La significatività statistica è stata valutata tramite Student's *t*-test ($p < 0.05$).

4. RISULTATI

4.1. Analisi istologica

Come già detto nella sezione Materiali e Metodi, per ogni paziente sono stati individuati tre campioni di tessuto, definiti N (tessuto sano), T (massa tumorale) e NT (tessuto “sano” nelle immediate vicinanze del tumore). L’analisi istologica ha messo in evidenza la presenza di un tessuto mammario molto differenziato, sia per quanto riguarda la stessa paziente che pazienti diverse. In particolare, soprattutto nelle sezioni N e NT, è stato possibile individuare la presenza di tessuto ghiandolare, tessuto connettivo e pannetto adiposo, in quantità diversa in base all’età della paziente. Nelle sezioni T, invece, si è osservata la presenza massiva del tumore. Grazie alla comparazione fra le sezioni istologiche H&E e le sezioni gemelle deparaffinate per l’analisi FTIR, è stato possibile individuare su queste ultime le zone di interesse, su cui acquisire le mappe IR. In Figura 4.1 sono riportate le microfotografie delle sezioni istologiche relative ai campioni N, NT e T di ogni paziente, colorate con H&E e le microfotografie delle aree selezionate per l’analisi FTIR Imaging. In particolare, per ogni paziente ci siamo focalizzati sull’epitelio ghiandolare e sullo stroma (entrambi sani) in N, sulla massa tumorale in T, e sullo stroma di tessuto “sano” nelle immediate vicinanze del tumore in NT.





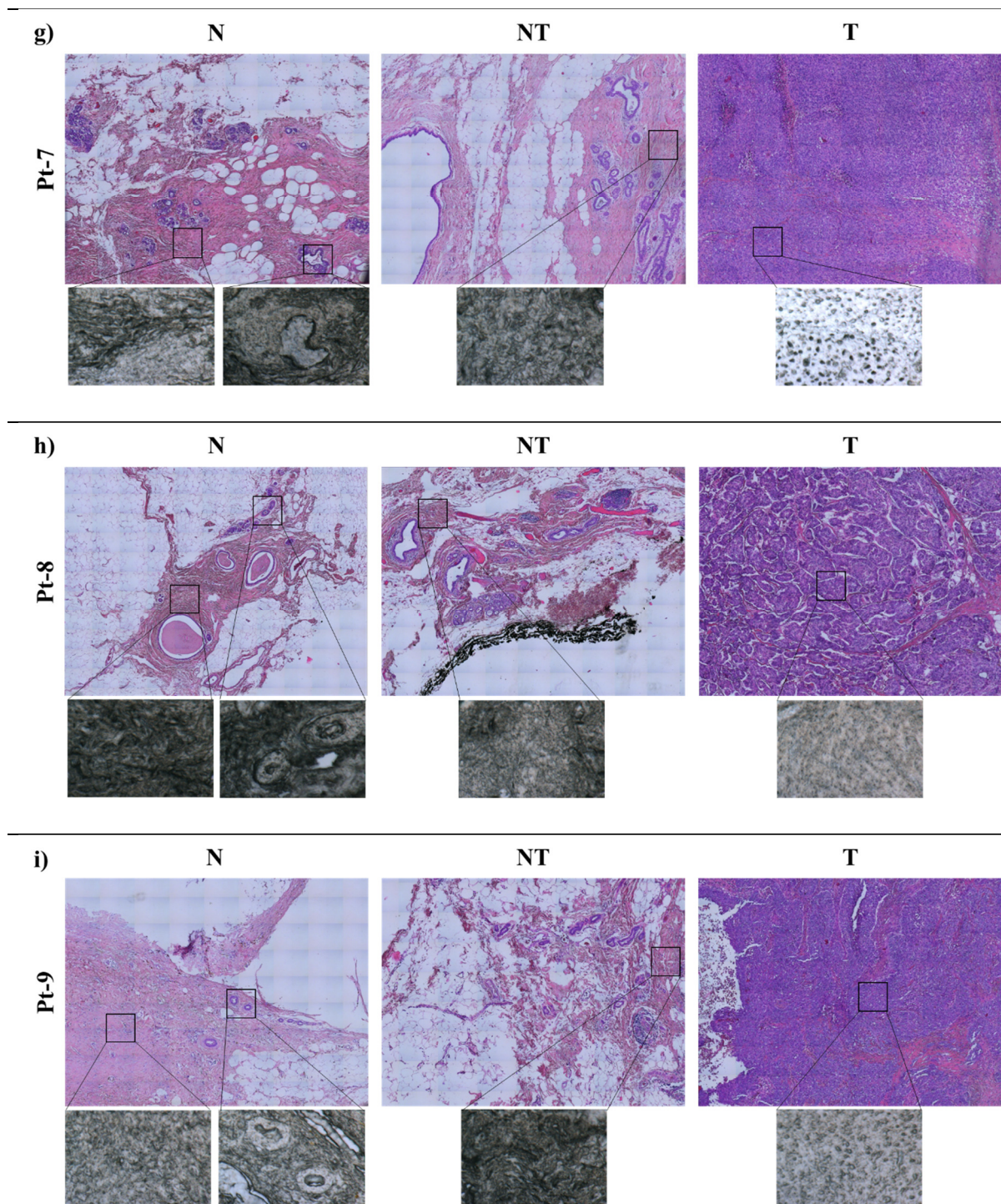
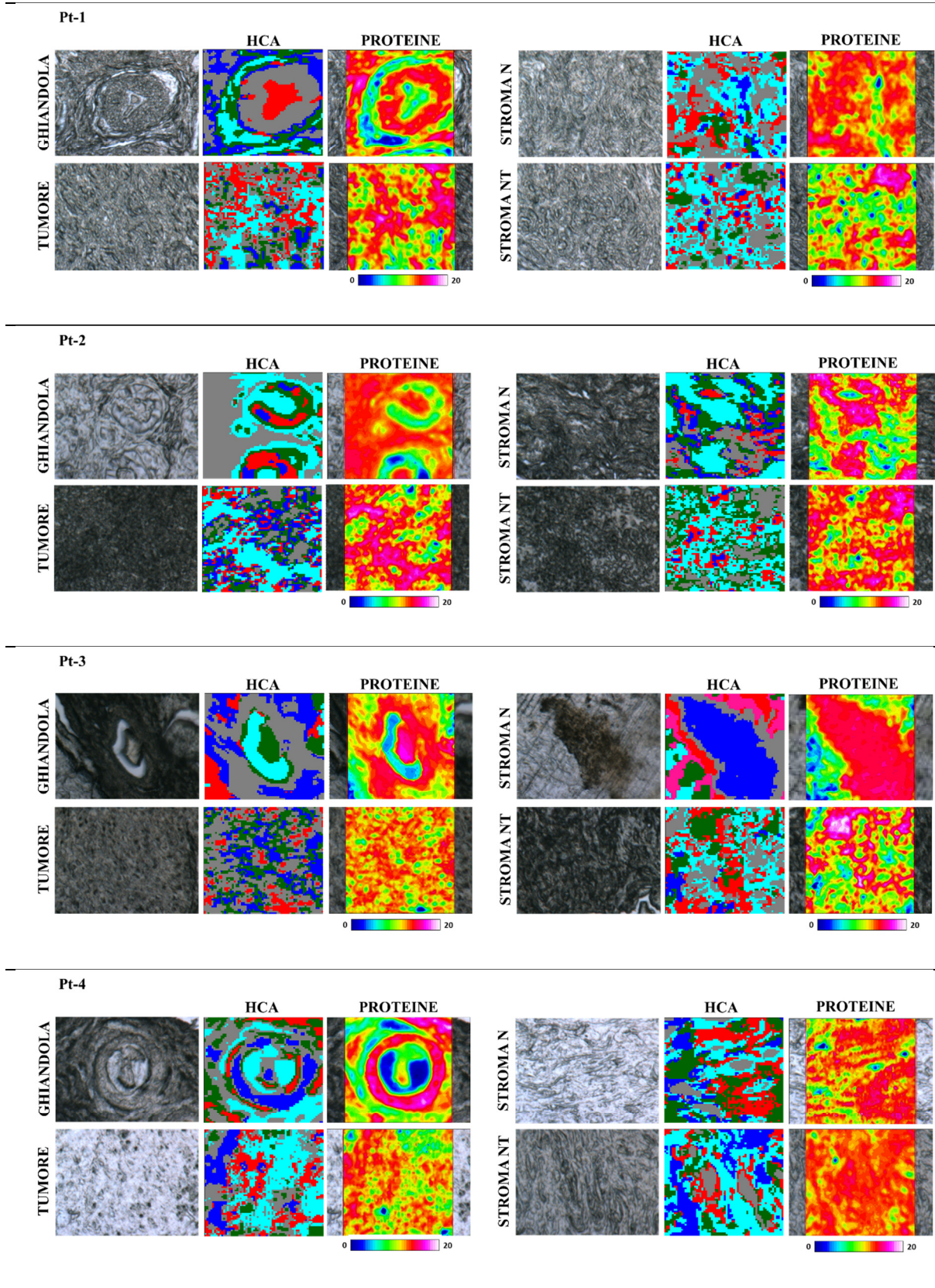


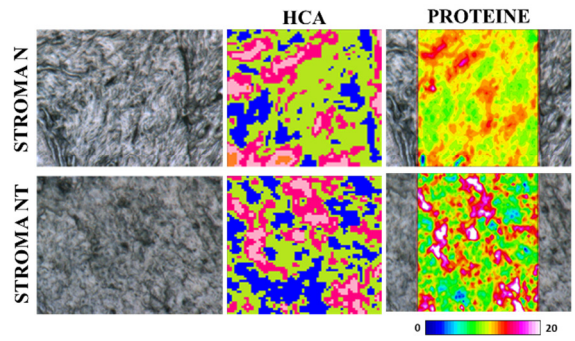
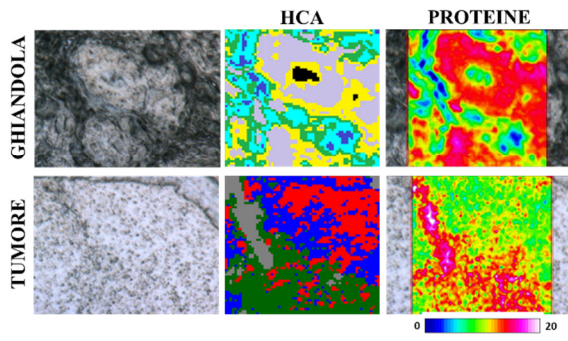
Figura 4.1. a) - i) Sezioni istologiche N, NT, T delle pazienti Pt-1 a Pt-9, con ingrandimento di microfotografia IR delle zone di interesse, riguardanti l'epitelio ghiandolare e il tessuto connettivo in N, la massa tumorale in T e il tessuto connettivo "sano" adiacente al tumore in NT.

4.2. Analisi FTIR Imaging

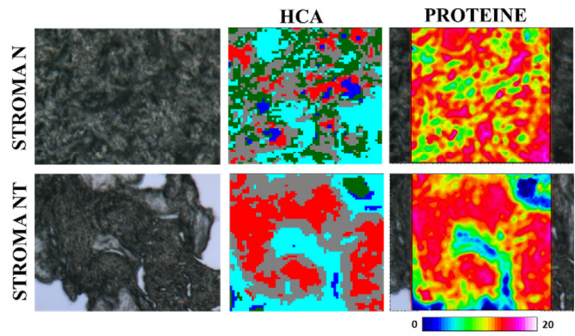
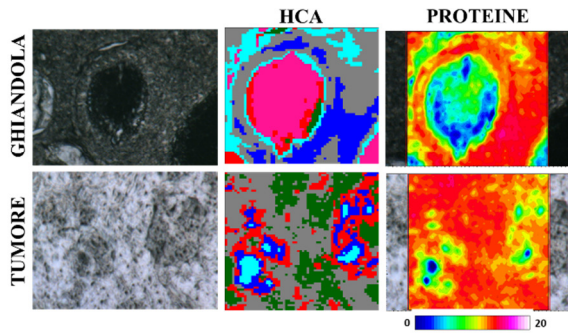
In Figura 4.2 sono riportate le microfotografie delle aree mappate e le relative immagini a falsi colori che rappresentano la distribuzione topografica delle proteine totali e quindi del collagene all'interno dell'area mappata. Tali immagini a falsi colori sono state ottenute integrando le mappe IR pre-processate nell'intervallo spettrale 1720-1480 cm^{-1} , relativo alle bande Ammide I e Ammide II delle proteine. Per ogni mappa IR sono inoltre riportate anche le immagini HCA che mostrano la presenza di diversi profili spettrali all'interno dell'area mappata e quindi di diverse componenti tissutali. In particolare, per ogni mappa sono state prese in considerazione l'epitelio di una ghiandola sana (in N), il tessuto tumorale (in T), lo stroma del tessuto sano (in N) e lo stroma adiacente al tumore (in NT). In generale, si osserva una eccellente corrispondenza fra le immagini HCA e la distribuzione delle proteine, ad indicare come i vari tipi di tessuto abbiano comunque un elevato contenuto proteico.



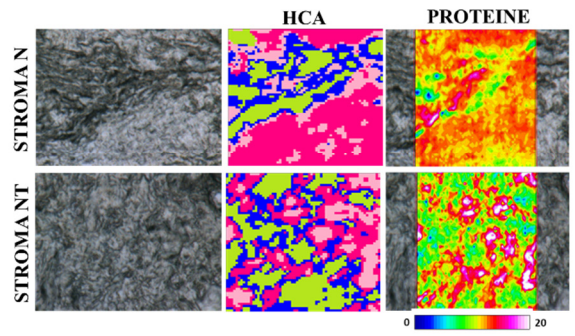
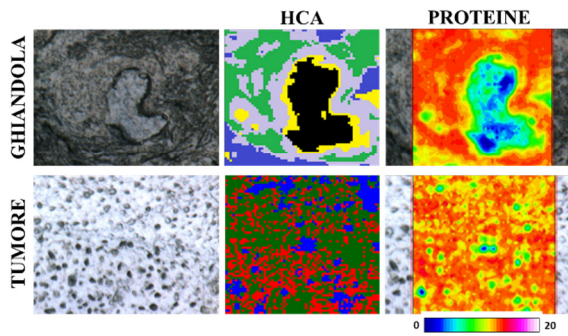
Pt-5



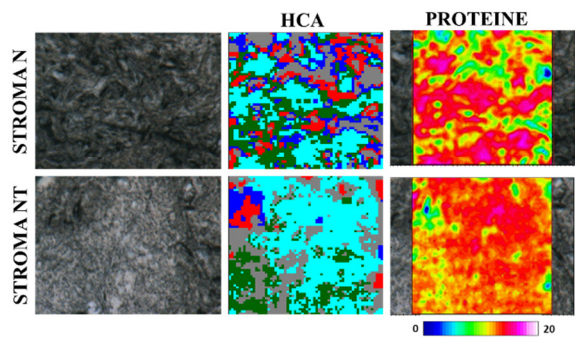
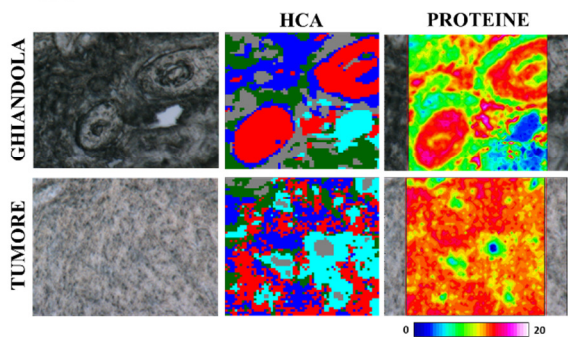
Pt-6



Pt-7



Pt-8



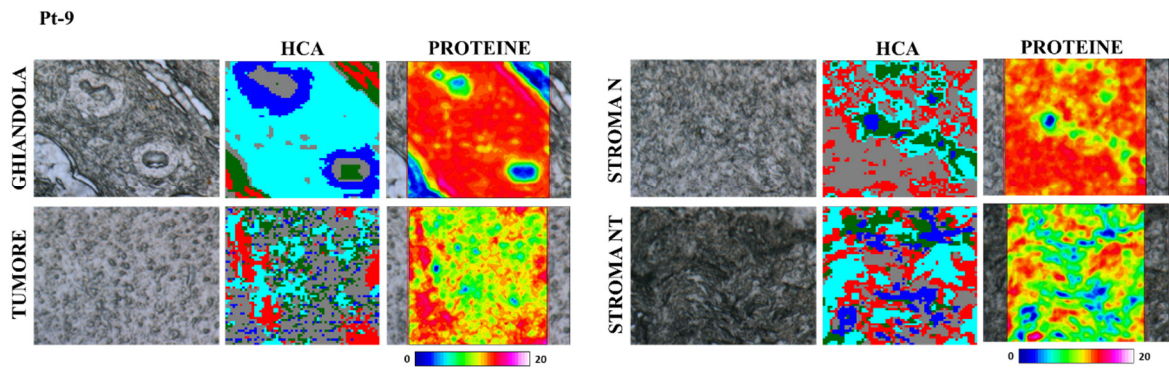


Figura 4.2. Microfotografie delle aree mappate, immagine HCA e immagine a falsi colori rappresentante la distribuzione topografica delle proteine totali e del collagene per ogni paziente (Pt-1 – Pt-9).

4.3. Analisi univariata

Per ogni paziente, sono stati calcolati e messi a confronto rispettivamente gli spettri medi dell'epitelio ghiandolare sano (GHIANDOLA) e della massa tumorale (TUMORE) e del tessuto connettivo sano (STROMA N) e adiacente al tumore (STROMA NT). Gli spettri medi sono stati quindi sottoposti ad analisi univariata nelle regioni spettrali $1730-1480\text{ cm}^{-1}$ e $1360-900\text{ cm}^{-1}$. In Figura 4.3, come esempio, sono riportati gli spettri IR medi in assorbanza, relativi alla paziente Pt-5, nelle regioni spettrali $1730-1480\text{ cm}^{-1}$ e $1360-900\text{ cm}^{-1}$ e i relativi *peak fitting* negli stessi intervalli spettrali. Lo scopo di questa analisi era evidenziare possibili differenze in termini di composizione

macromolecolare fra (1) epitelio ghiandolare sano e massa tumorale e (2) stroma sano e stroma adiacente al tumore. In particolare, sono stati analizzati i seguenti marker spettrali (sia come singola area A delle bande che come rapporti di area delle bande; Figura 4.4):

- $(A_{1688}+A_{1627})/AI$, A_{1671}/AI , A_{1655}/AI , A_{1642}/AI (rispettivamente strutture beta, turn, alfa e random coil delle proteine rispetto alla banda Ammide I);
- A_{1342} (prolina);
- A_{1173}/A_{1158} (indicatore di tumorigenicità);
- A_{1079} (fosfati interni legati al DNA);
- A_{962} (scheletro del DNA);
- A_{934} (livello di metilazione del DNA) (934 cm^{-1}).

Secondo quanto emerge dalla comparazione tra gli spettri medi della ghiandola sana (GHIANDOLA) e della massa tumorale (TUMORE) e dei relativi spettri dopo procedura di *peak fitting* contenenti le sottobande componenti (Figura 4.3a), si osserva una certa variabilità in entrambe le regioni spettrali analizzate ($1720\text{-}1480\text{ cm}^{-1}$, relativa alle bande Ammide I e Ammide II delle proteine, e $1350\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, relativa al collagene e agli acidi nucleici). In particolare, per quanto riguarda l'organizzazione della struttura secondaria delle proteine, si osservano diverse differenze fra la componente

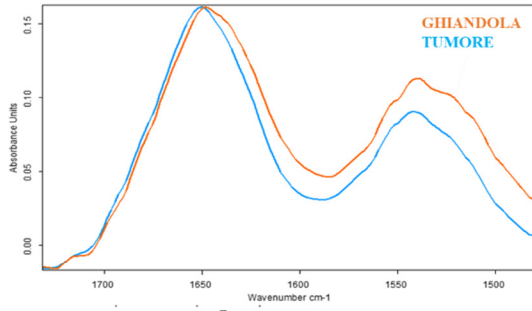
ghiandola sana e la porzione patologica; la ghiandola mostra valori più alti, seppur non significativi, di strutture meno organizzate come turns (A_{1671}/AI) e random coils (A_{1642}/AI), mentre la massa tumorale presenta maggiori strutture proteiche con organizzazione α -elica (A_{1655}/AI) e β -sheets ($(A_{1688}+A_{1627})/AI$) (Figura 4.4a). Per quanto riguarda l'andamento degli altri marker spettrali considerati, il rapporto di tumorigenicità (A_{1173}/A_{1158}) mostra valori nettamente più alti nel tumore rispetto alla ghiandola sana. Valori molto simili o poco discostanti sono stati riscontrati nell'area della banda A_{1079} relativa ai fosfati interni del DNA, così come nell'area della banda A_{962} relativa al DNA, dove però valori leggermente più alti sono stati osservati nella massa tumorale, probabilmente dovuti ad una maggiore presenza cellulare (Figura 4.4a). Ciò che invece confermerebbe la maggiore tumorigenicità della componente tumorale sarebbe l'andamento dell'area della banda A_{934} , dove si riscontra un più basso valore di metilazione del DNA nel tumore, causato da un tasso di replicazione più alto rispetto a quello registrato nella ghiandola sana (Figura 4.4a).

In modo analogo, le stesse considerazioni sono state effettuate paragonando i dati spettrali relativi allo stroma sano (STROMA N) e a quello nelle immediate vicinanze del tumore (STROMA NT) (Figura 4.3b). L'andamento delle strutture secondarie delle proteine (Figura 4.4b) riflette la tendenza

osservata nel confronto precedente: ancora una volta è la componente sana (STROMA N) a registrare più alti valori di strutture meno ordinate come turns (A_{1671}/AI) e random coils (A_{1642}/AI), mentre la maggior presenza di α -elica (A_{1655}/AI) e β -sheets ($(A_{1688}+A_{1627})/AI$) nello stroma NT lascia presagire una vicinanza al tumore. Nel caso dello stroma, abbiamo considerato, tra i vari marker spettrali, anche l'andamento dell'area della banda A_{1342} assegnata alla prolina: questo amminoacido è particolarmente abbondante nella sequenza proteica del collagene in quanto rappresenta uno dei tre amminoacidi che si ripetono nelle α -eliche che costituiscono la tipica struttura a tripla elica della proteina. Infatti, essendo una delle componenti più abbondanti della ECM, è facilmente riscontrabile in ambienti come quello dello stroma. In questo caso però, sembrano non esserci differenze particolari tra lo stroma sano (STROMA N) e lo stroma sano vicino al tumore (STROMA NT), così come per gli andamenti relativi ai fosfati (A_{1079}) e al DNA (A_{962}). Ciò che invece discrimina maggiormente i due microambienti adiacenti è il livello di metilazione del DNA (A_{934}): sembra infatti che la porzione NT risenta maggiormente delle strette vicinanze con la massa tumorale, in quanto si registra un più basso valore di metilazione rispetto allo stroma N.

a)

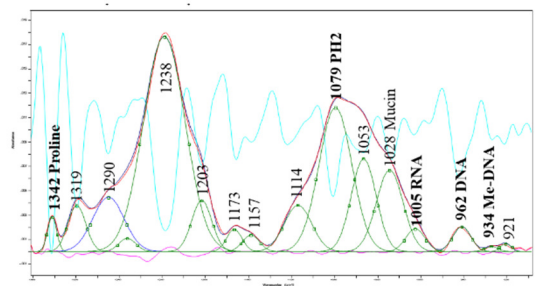
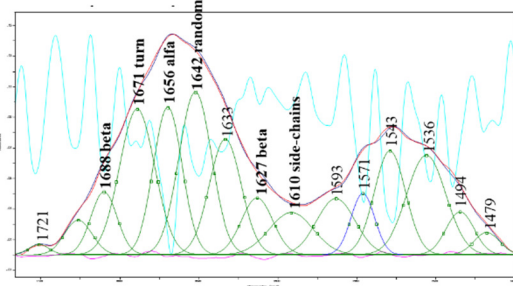
1730-1480 cm^{-1}



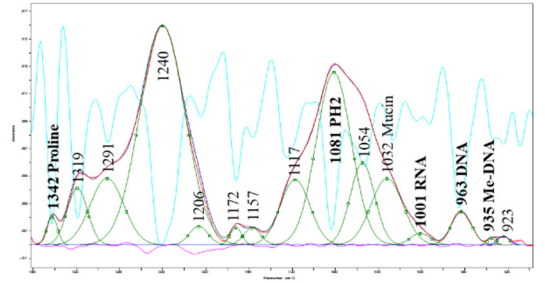
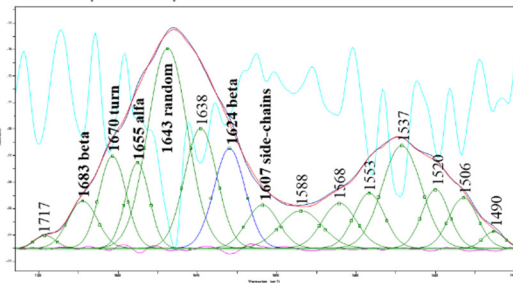
1360-900 cm^{-1}



GHIANDOLA



TUMORE



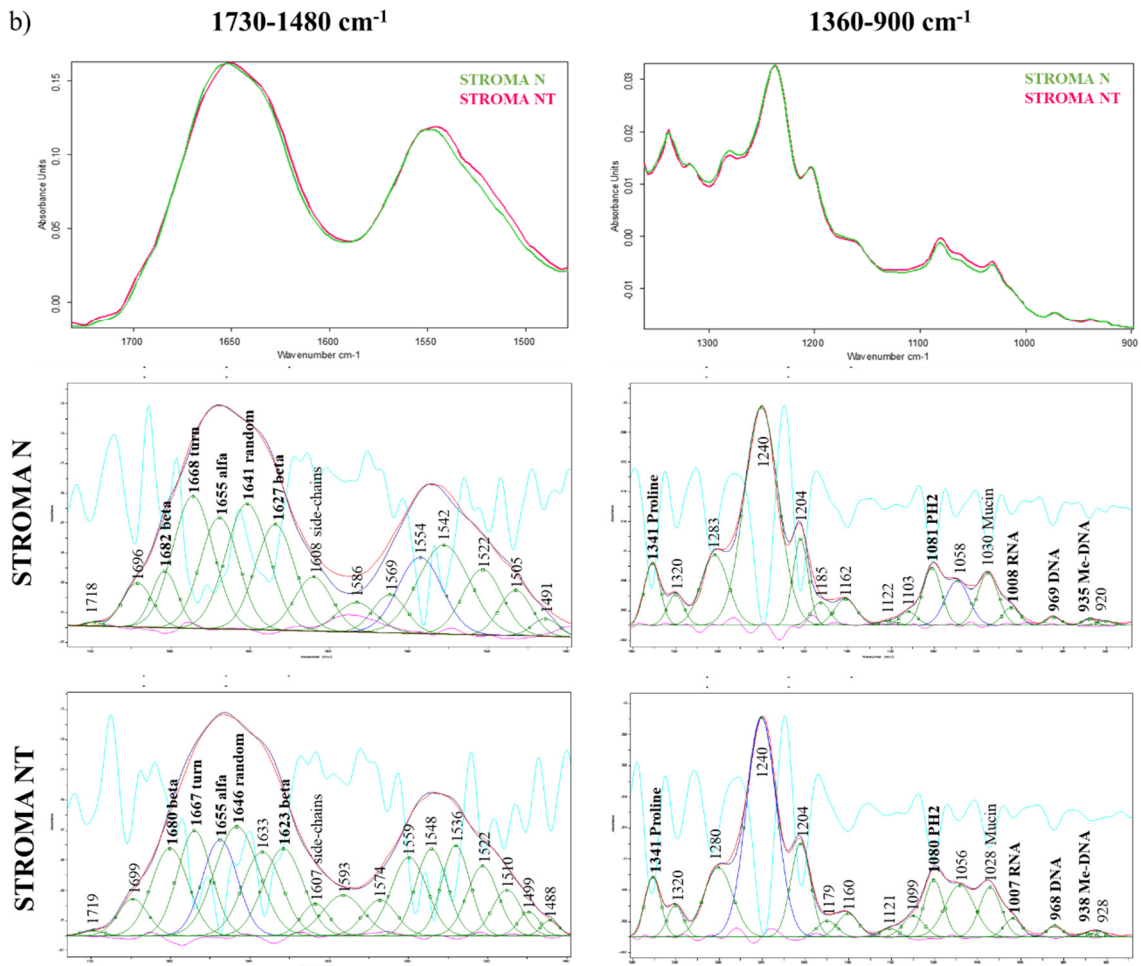
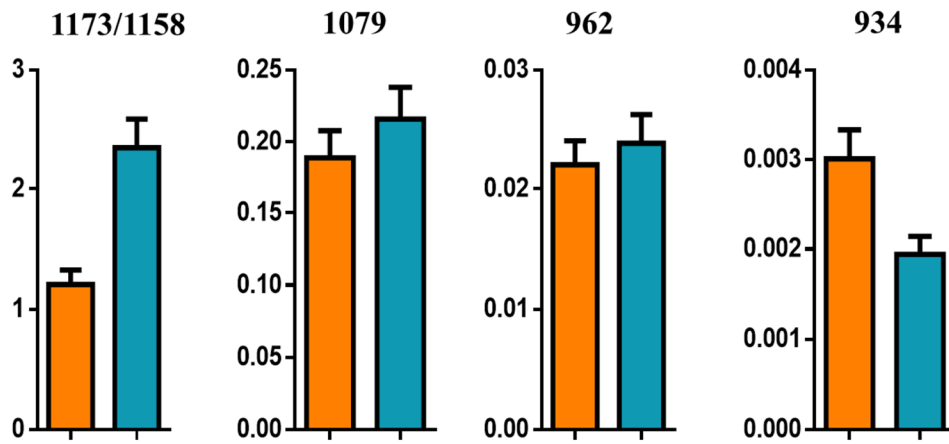
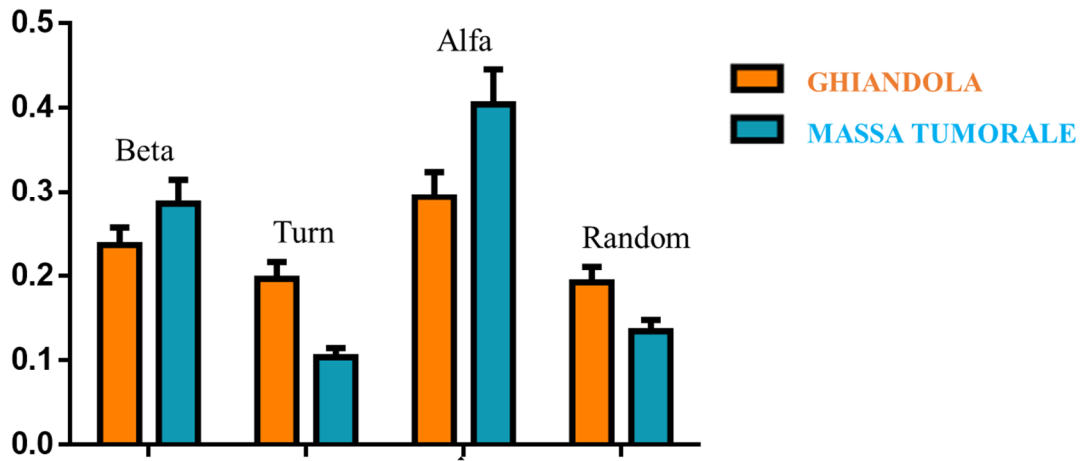


Figura 4.3. Spettri medi in assorbanza nelle regioni spettrali $1730-1480 \text{ cm}^{-1}$ e $1360-900 \text{ cm}^{-1}$ e relativo fitting negli stessi intervalli spettrali per a) ghiandola e massa tumorale e b) stroma N e stroma NT.

a) **STRUTTURA SECONDARIA DELLE PROTEINE**



b) STRUTTURA SECONDARIA DELLE PROTEINE

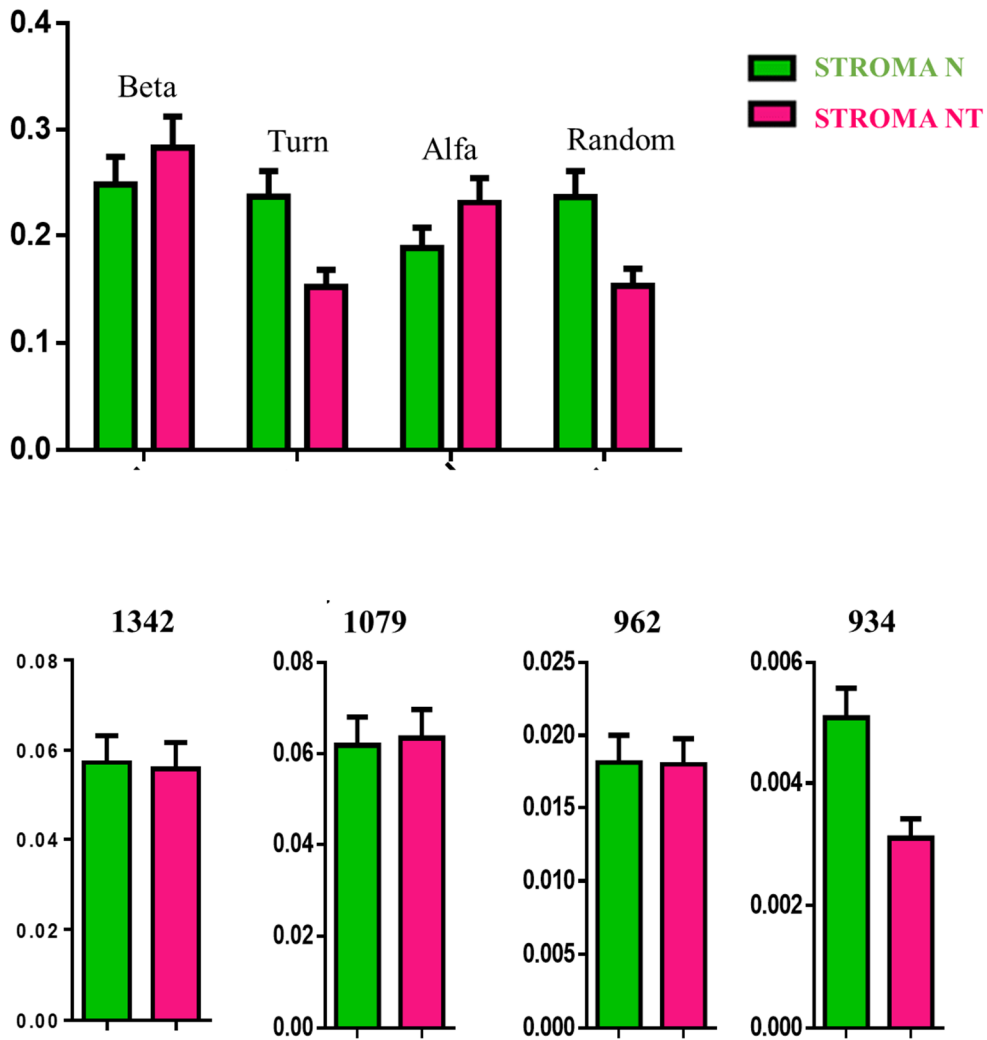


Figura 4.4. Marker spettrali tra a) ghiandola N e tumore T e b) stroma N e NT. L'analisi statistica è stata valutata tramite Student's t-test con $p < 0.05$ (software Prism 6.0, GraphPad Software, San Diego, CA).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il carcinoma duttale invasivo con fenotipo triplo negativo rappresenta oggi uno dei più frequenti carcinomi mammari, per il quale purtroppo non si dispone ancora di una diagnosi precoce e di una terapia specifica mirata [67,71,72].

Per questo motivo, abbiamo deciso di impiegare a scopo diagnostico la spettroscopia FTIR Imaging nello studio di questa neoplasia, per approfondire alcuni dettagli biomolecolari e per cercare di rispondere a quesiti ai quali l'analisi istologica non riesce a fornire informazioni dettagliate. Infatti, la spettroscopia FTIR Imaging, tramite l'acquisizione di mappe IR ad elevata risoluzione spaziale (ca. 2,56 μm), permette di correlare le informazioni relative alla morfologia del campione con la sua composizione macromolecolare, in termini di pattern proteico e struttura secondaria delle proteine, composizione lipidica, stress ossidativo, conformazione degli acidi nucleici, presenza di gruppi fosfato e di composti glicosilati.

Dopo aver selezionato i campioni di IDC-TNBC, è stata svolta una complessa valutazione delle aree da studiare, grazie anche alle immagini istologiche colorate con Ematossilina ed Eosina (H&E). Poiché il tumore IDC-TNBC origina dalle cellule dell'epitelio delle ghiandole, si è cercata inizialmente una

correlazione tra la composizione biomolecolare della ghiandola sana e del tessuto tumorale; quindi, si è valutata la composizione macromolecolare dello stroma sano e dello stroma nelle immediate vicinanze del tumore, in modo da valutare come la proliferazione della massa tumorale potesse influenzare questo microambiente.

Purtroppo, dato il limitato numero di pazienti (N. 9) e vista l'elevata variabilità in termini di composizione del tessuto mammario tra pazienti di diversa età, abbiamo deciso di focalizzarci solo sulle pazienti giovani (età media 42 ± 5 anni) per ridurre la variabilità.

Anche se questo studio di tesi deve essere considerato preliminare, visto il limitato numero di campioni, è stato comunque possibile ottenere informazioni interessanti sulle diverse componenti tissutali analizzate. In particolare, l'analisi *imaging* iperspettrale delle mappe HCA e delle immagini a falsi colori relative alla distribuzione proteica, ha consentito di: (1) identificare una diversa composizione macromolecolare delle principali strutture istologiche nelle sezioni chirurgiche IDC-TNBC, discriminando tra strato epiteliale sano e il corrispondente tessuto tumorale; (2) valutare la presenza di un microambiente simil-tumorale nel tessuto connettivo vicino al tumore, evidenziando la diffusione della massa tumorale nello stroma adiacente.

L'analisi univariata dei dati spettrali ha fornito inoltre numerose informazioni sulla composizione macromolecolare dei diversi componenti tissutali. Infatti, secondo quanto emerge dalla comparazione tra gli spettri medi della ghiandola sana (GHIANDOLA) e della massa tumorale (TUMORE), si osserva una certa variabilità in entrambe le regioni spettrali analizzate (1720-1480 cm^{-1} , relativa alle bande Ammide I e Ammide II delle proteine, e 1350-900 cm^{-1} , relativa al collagene e agli acidi nucleici). In particolare, per quanto riguarda l'organizzazione della struttura secondaria delle proteine, si osservano diverse differenze fra la componente ghiandolare sana e la porzione patologica; la ghiandola mostra valori più alti, seppur non significativi, di strutture meno organizzate come turns (A_{1671}/AI) e random coils (A_{1642}/AI), mentre la massa tumorale presenta maggiori strutture proteiche con organizzazione α -elica (A_{1655}/AI) e β -sheets ($(A_{1688}+A_{1627})/AI$) [116,117]. Per quanto riguarda l'andamento degli altri marker spettrali considerati, il rapporto di tumorigenicità (A_{1173}/A_{1158}) mostra valori nettamente più alti nel tumore rispetto alla ghiandola sana. Valori molto simili o poco discostanti sono stati riscontrati nell'area della banda A_{1079} relativa ai fosfati interni del DNA, così come nell'area della banda A_{962} relativa al DNA, dove però valori leggermente più alti sono stati osservati nella massa tumorale, probabilmente dovuti ad una maggiore presenza cellulare. Ciò che invece confermerebbe la

maggiore tumorigenicità della componente tumorale sarebbe l'andamento dell'area della banda A_{934} , dove si riscontra un più basso valore di metilazione del DNA nel tumore, causato da un tasso di replicazione più alto rispetto a quello registrato nella ghiandola sana [96,118-122].

L'analisi dei dati spettrali dello stroma sano (STROMA N) e di quello nelle immediate vicinanze del tumore (STROMA NT) ha messo in evidenza come l'andamento delle strutture secondarie delle proteine rifletta la tendenza osservata fra stroma epiteliale sano e massa tumorale: la componente sana (STROMA N) mostra più alti valori di strutture meno ordinate come turns (A_{1671}/AI) e random coils (A_{1642}/AI), mentre la maggior presenza di α -elica (A_{1655}/AI) e β -sheets ($(A_{1688}+A_{1627})/AI$) nello stroma NT lascia presagire una vicinanza al tumore [116,117]. Per quanto riguarda il collagene, abbiamo analizzato l'area della banda A_{1342} assegnata alla prolina: questo amminoacido è particolarmente abbondante nella sequenza proteica del collagene in quanto rappresenta uno dei tre amminoacidi che si ripetono nelle α -eliche che costituiscono la tipica struttura a tripla elica della proteina. Infatti, essendo una delle componenti più abbondanti della ECM, è facilmente riscontrabile in ambienti come quello dello stroma [123]. In questo caso però, sembrano non esserci differenze particolari tra lo stroma sano (STROMA N) e lo stroma sano vicino al tumore (STROMA NT), così come per gli andamenti relativi ai

fosfati (A_{1079}) e al DNA (A_{962}). Ciò che invece discrimina maggiormente i due microambienti adiacenti è il livello di metilazione del DNA (A_{934}): sembra infatti che la porzione NT risenta maggiormente delle strette vicinanze con la massa tumorale, in quanto si registra un più basso valore di metilazione rispetto allo stroma N [96,118-122].

In conclusione, possiamo affermare che l'analisi FTIR Imaging fin qui effettuata ha messo in luce differenze macromolecolari significative fra epitelio ghiandolare sano e massa tumorale; in particolare, è stato possibile identificare i seguenti marker spettrali identificativi di IDC TNBC: A_{1655}/AI , $(A_{1688}+A_{1627})/AI$, A_{1173}/A_{1158} e A_{934} . Inoltre, è stato possibile individuare nel tessuto connettivo adiacente alla massa tumorale, dei valori dei marker spettrali di cui sopra simili a quelli del tessuto tumorale, facendo chiaramente intendere come il tumore svolga una funzione di infiltrazione nel microambiente

Sulla base dei risultati ottenuti, il prossimo passo sarà quello di implementare il numero di pazienti al fine di migliorare l'analisi statistica, e di correlare il dato spettrale con la prognosi delle pazienti (guarigione, metastasi e/o morte).

6. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il laboratorio di spettroscopia DiSVA e la professoressa Elisabetta Giorgini, per avermi dato la possibilità di partecipare ad un progetto di ricerca così interessante e di lavorare con uno degli strumenti più all'avanguardia, permettendo di arricchire le mie conoscenze.

Ringrazio Alessia Belloni e Valentina Notarstefano per l'aiuto essenziale, i consigli e il tempo dedicatomi durante questo percorso.

Ringrazio il reparto di anatomia patologica di "Ospedali Riuniti Marche Nord" per i campioni fornitici e, in particolare, il professor Alfredo Santinelli e il dottor Vincenzo Catalano per i dati e le indispensabili delucidazioni.

Ringrazio mia sorella Elisa, mia nonna e tutta la mia famiglia, sempre presenti e interessati.

Ringrazio le mie amiche, perché so che potrò sempre contare su di loro.

Dei ringraziamenti speciali vanno ai miei genitori, per avermi sempre sostenuta e spronata, e ad Alessandro, per la sua infinita pazienza e per essere il mio porto sicuro. Mi siete stati vicini soprattutto nello sconforto ed è anche grazie a voi che sono arrivata fin qui.

Dedico questo elaborato a mio nonno Sergio, perché mi ha insegnato a non mollare mai, ha sempre creduto in me e penso sarebbe molto fiero di questo traguardo.

7. BIBLIOGRAFIA

1. T W Sadler. *Langman's Medical Embryology*. 11th. s.l. : Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
2. *Breast Anatomy for the Interventionalist*. R A Jesinger. Mar 2014, Tech Vasc Interv Radiol, 17(1):3-9.
3. *Various types and management of breast cancer: an overview*. G N Sharma, R Dave, J Sanadya, P Sharma, KK Sharma. Apr-Jun 2010, J. Adv. Pharm. Tech. Res.
4. F H Martini, M J Timmons, R B Tallitsch. *Anatomia Umana*. 5th. s.l. : EdiSES, 2012.
5. A P Cooper. *Anatomy of the Breast*. London : Longman, Orme, Brown, Green, and Longmans, 1840.
6. *[Applied anatomy of the breast: blood supply and innervation]*. B Ricbourg. Dec 1992, Ann Chir Plast Esthet, 37(6):603-20.
7. *[The map of superficial lymphatic system of the breast and relation to the sentinel lymph node]* . D Pavlista, O Eliska. May 2005, Ceska Gynekol, 70(3):192-7.
8. <https://histology.medicine.umich.edu/resources/mammary-gland>.
9. *Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge* . F Hassiotou, D Geddes. Jan 2013, Clin Anat, 26(1):29-48.
10. *Cyclical Dedifferentiation and Redifferentiation of Mammary Adipocytes*. C A S Corsa, O A MacDougald. Aug 2018, Cell Metab, 28(2):187-189.
11. *Diverse and active roles for adipocytes during mammary gland growth and function* . R C Hovey, L Aimo. Sep 2010, J Mammary Gland Biol Neoplasia, 15(3):279-90.

12. *Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer*. J Muschler, C H Streuli. Oct 2010, Cold Spring Harb Perspect Biol, 2(10):a003202.
13. A Aranda-Gutierrez, H M Diaz-Perez. StatPearls. *Histology, Mammary Glands*. [Online] May 2021.
14. *Cancer statistics, 2020*. R L Siegel, K D Miller, A Jemal. Jan 2020, CA Cancer J Clin, 70(1):7-30.
15. *Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis*. Y Feng, M Spezia, S Huang, et al. Jun 2018, Genes & Diseases, 5(2): 77–106.
16. *Breast cancer in young women: an overview*. Z Anastasiadi, G D Lianos, E Ignatiadou, H V Harissis, M Mitsis. Sep 2017, Updates Surg, 69(3):313-317.
17. *Breast cancer risk factors*. M Kamińska, T Ciszewski, K Łopacka-Szatan, P Miotła, E Starosławska. Sep 2015, Prz Menopauzalny, 14(3): 196–202.
18. *Breast cancer*. U Veronesi, P Boyle, A Goldhirsch, R Orecchia, G Viale. May 2005, The Lancet, 365: 1727–41.
19. *The current state of breast cancer classification*. G Viale. Sep 2012, Annals of Oncology, Vol. 23 Suppl 10:x207-10.
20. *Molecular Pathology of Breast Cancer: What a Pathologist Needs to Know*. K H Allison. 6 Dec 2012, American Journal of Clinical Pathology, Vol. 138, p. 770–780.
21. *Updates in the Evaluation and Management of Breast Cancer*. C C O'Sullivan, C L Loprinzi, T C Haddad. Jun 2018, Mayo Clin Proc, 93(6):794-807.
22. *Diagnosis of Breast Cancer by Optical Image Analysis*. S J Attia, J M Blackledge, Z M Abood, I R Agool. ISSC. NUI Maynooth : s.n., 2012.

23. *Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers.* G K Malhotra, X Zhao, H Band, V Band. Nov 2010, *Cancer Biol Ther*, 10(10): 955–960.
24. E Rubin, H M Reisner. *L'essenziale di anatomia patologica.* s.l. : Piccin, 2014.
25. *Molecular portraits of human breast tumours.* C M Perou et al. Aug 2000, *Nature*, 406, pages 747–752.
26. *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.* T Sørlie et al. Sep 2001, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19):10869-74.
27. *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.* T Sørlie et al. Jul 2003, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14): 8418–8423.
28. *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.* A Prat et al. 2010, *Breast Cancer Res*, 12(5): R68.
29. *The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas.* C R Ehemann, K M Shaw, A B Ryerson, J W Miller, U A Ajani, M C White. 2009, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 18(6):1763–9.
30. *A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition.* H-P Sinn, H Kreipe. May 2013, *Breast Care (Basel)*, 8(2): 149–154.
31. *Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance.* J Makki, Dec 2015, *Clin Med Insights Pathol*, 8:23-31
32. *WHO Classification of Tumours of the Breast.* S R Lakhani, I O Ellis, S J Schnitt, P H Tan, M J Van de Vijver, eds. Fourth ed. IARC, Lyon; 2012. ISBN.13.
33. <https://radiopaedia.org/articles/invasive-ductal-carcinoma>.
34. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology.* J Rosai. Tenth ed. Elsevier, Lyon, France; 2011.

35. *Pathobiology of Human Disease*. A Sahin, H Zhang. 2014, 934-951.
36. *Invasive lobular breast cancer. Prognostic significance of histological malignancy grading*. M L Talman, M B Jensen, F Rank. 2007, *Acta Oncol.*, 46:803–809.
37. P P Rosen. *Rosen's Breast Pathology*. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Lyon, France; 2009.
38. *Metaplastic breast cancer: Clinicopathological features and its prognosis*. H Lee, S Y Jung, J Y Ro, et al. 2012, *J Clin Pathol.*, 65:441–446.
39. *Breast carcinoma with micropapillary features: Clinicopathologic study and long-term follow-up of 100 cases*. L Chen, Y Fan, RG Lang, et al. 2008, *Int J Surg Pathol.*, 16:155–163
40. *The prognostic significance of inflammation and medullary histological type in invasive carcinoma of the breast*. E A Rakha, M Aleskandarany, M E El-Sayed, et al. 2009, *Eur J Cancer.*, 45:1780–1787.
41. M Farid. *Essentials of Diagnostic Breast Pathology, Practical Approach*. 1st ed. Berlin: Springer; 2007. ISBN 978-3-540-45117-4.
42. *Androgen receptor in breast cancer: Expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation*. L A Niemeier, D J Dabbs, S Beriwal, et al. 2010, *Mod Pathol.*, 23:205–212.
43. *Neuroendocrine differentiation and prognosis in breast adenocarcinoma*. A Miremadi, S Pinder, A Lee, et al. 2002, *Histopathology.*, 40:215–222.
44. *Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives*. J E Visvader, J Stingl. Jun 2014, *Genes Dev*, 28(11):1143-58.
45. *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. D Bonnet, J E Dick. Jul 1997, *Nat Med*, 3(7):730-7.

46. *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.* M Al-Hajj, M S Wicha, A Benito-Hernandez, J Morrison, M F Clarke. Apr 2003, Proc Natl Acad Sci U S A, 100(7):3983-8.
47. *Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer.* M D Brooks, M L Burness, M S Wicha. Sep 2015, Cell Stem Cell, 17(3):260-71.
48. *Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis .* J Stingl, C Caldas. Oct 2007, Nat Rev Cancer, 7(10):791-9.
49. *Breast cancer: origins and evolution.* K Polyak. Nov 2007, J Clin Invest, 117(11):3155-63.
50. *Histological and biological evolution of human premalignant breast disease.* D C Allred, S K Mohsin, S A Fuqua. Mar 2001, Endocr Relat Cancer, 8(1):47-61.
51. *Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer.* M Allinen et al. Jul 2004, Cancer Cell, 6(1):17-32.
52. *Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation.* B Elenbaas, R A Weinberg. Mar 2001, Exp Cell Res, 264(1):169-84.
53. *Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers.* S H Jafari et al. Jul 2018, J Cell Physiol, 233(7):5200-5213.
54. <https://www.breastcancer.org/symptoms/types/idc/tests/more>.
55. *Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype .* N A Soliman, S M Yussif. Dec 2016, Cancer Biol Med, 13(4): 496–504.
56. *Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry.* E C Inwald, M Klinkhammer-Schalke, F Hofstädter, F Zeman, M Koller, M Gerstenhauer, O Ortmann. 2013, Breast Cancer Res Treat., 139(2): 539–552.

57. *Treatment of breast cancer*. G N Hortobagyi. 14, Oct 1998, The New England Journal of Medicine, Vol. 339.
58. <https://www.aimac.it/libretti-tumore/cancro-mammella-seno/chirurgia-cancro-mammella>.
59. *Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy*. S A Castaneda, J Strasser. Jul 2017, Surg Oncol Clin N Am, 26(3):371-382.
60. *Breast conservation is a safe method in patients with small cancer of the breast. Long-term results of three randomised trials on 1,973 patients*. U Veronesi et al. Sep 1995, Eur J Cancer, 31A(10):1574-9.
61. *Radiotherapy after breast-conserving surgery in small breast carcinoma: long-term results of a randomized trial*. U Veronesi et al. Jul 2001, Ann Oncol, 12(7):997-1003.
62. *Breast cancer biomarkers: risk assessment, diagnosis, prognosis, prediction of treatment efficacy and toxicity, and recurrence*. A M Braden, R V Stankowski, J M Engel, A A Onitilo. 2014, Curr Pharm Des, 20(30):4879-98.
63. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-survival-rates.html>.
64. *Supportive care after curative treatment for breast cancer (survivorship care): resource allocations in low- and middle- income countries. A Breast Health Global Initiative 2013 consensus statement*. P A Ganz et al. 2013, Breast, 22, 606–615.
65. *Breast cancer*. N Harbeck et al. 2019, Nat Rev Dis Primers, 5(1):66.
66. *Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?* J D Brenton, L A Carey, A A Ahmed, C Caldas. Oct 2005, J Clin Oncol, 23(29):7350-60.
67. *Triple-negative breast cancer*. W D Foulkes, I E Smith, J S Reis-Filho. Nov 2010, N Engl J Med, 363(20):1938-48.

68. *The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race* . K F Trivers, M J Lund, P L Porter, J M Liff, E W Flagg, R J Coates, J W Eley. Sep 2009, *Cancer Causes Control*, 20(7):1071-82.
69. *Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer*. A M Gonzalez-Angulo et al. Mar 2011, *Clin Cancer Res*, 17(5):1082-9.
70. *Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. C A Livasy, G Karaca, R Nanda, M S Tretiakova, O I Olopade, D T Moore, C M Perou. Feb 2006, *Mod Pathol*, 19(2):264-71.
71. *Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and patterns of recurrence*. R Dent et al. Aug 2007, *Clin Cancer Res*, 13(15 Pt 1):4429-34.
72. *Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease*. G Bianchini, J M Balko, I A Mayer, M E Sanders, L Gianni. Nov 2016, *Nat Rev Clin Oncol*, 13(11): 674–690.
73. *The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC)*. E A O'Reilly et al. Mar 2015, *BBA Clin*, 3:257-75.
74. *CALGB (Alliance) 40603: Long-term outcomes (LTOs) after neoadjuvant chemotherapy (NACT) +/- carboplatin (Cb) and bevacizumab (Bev) in triple-negative breast cancer (TNBC)*. W M Sikov et al. May 2019, *Journal of Clinical Oncology* , 591-591.
75. *TBCRC009: A Multicenter Phase II Clinical Trial of Platinum Monotherapy With Biomarker Assessment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer*. S J Isakoff et al. Jun 2015, *J Clin Oncol*, 33(17):1902-9.
76. *Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy?* B Weigelt, J S Reis-Filho. Dec 2009, *Nat Rev Clin Oncol*, 6(12):718-30.
77. *Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers*. F Bertucci et al. May 2006, *Cancer Res*, 66(9):4636-44.

78. *How basal are triple-negative breast cancers?* F Bertucci, P Finetti, N Cervera, B Esterni, F Hermitte, P Viens, D Birnbaum. Jul 2008, *Int J Cancer*, 123(1):236-40.
79. *Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes.* J S Parker et al. Mar 2009, *J Clin Oncol*, 27(8):1160-7.
80. *Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes.* B D Lehmann, J A Pietenpol. Jan 2014, *J Pathol*, 232(2):142-50.
81. *Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies.* B D Lehmann et al. Jul 2011, *J Clin Invest*, 121(7):2750-67.
82. *The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups.* C Curtis et al. Apr 2012, *Nature*, 486(7403):346-52.
83. *Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype.* M C U Cheang et al. Mar 2008, *Clin Cancer Res*, 14(5):1368-76.
84. *Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer.* R Dent et al. May 2009, *Breast Cancer Res Treat*, 115(2):423-8.
85. *Central pathology laboratory review of HER2 and ER in early breast cancer: an ALTO trial [BIG 2-06/NCCTG N063D (Alliance)] ring study.* A E McCullough et al. Feb 2014, *Breast Cancer Res Treat*, 143(3):485-92.
86. *FOXO3a expression is associated with lymph node metastasis and poor disease-free survival in triple-negative breast cancer.* A Rehman, Y Kim, H Kim, J Sim, H Ahn, M S Chung, S Shin, K Jang. Sep 2018, *J Clin Pathol*, 71(9):806-813.
87. *In vivo Reprogramming of Cancer Metabolism by MYC.* R Camarda, J Williams, A Goga. Apr 2017, *Front Cell Dev Biol*, 5:35.
88. *Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies .* C Denkert, C Liedtke, A Tutt, G von Minckwitz. Jun 2017, *Lancet*, 389(10087):2430-2442.

89. *Triple-Negative Breast Cancer: Next-Generation Sequencing for Target Identification*. J D Marotti, F B de Abreu, W A Wells, G J Tsongalis. Oct 2017, *Am J Pathol*, 187(10):2133-2138.
90. *Role of tumor microenvironment in triple-negative breast cancer and its prognostic significance*. T Yu, G Di. Jun 2017, *Chin J Cancer Res*, 29(3): 237–252.
91. *Studio di biomateriali usati come scaffold per Tissue Engineering e loro caratterizzazione con tecniche spettroscopiche vibrazionali e di analisi termica*. M Di Foggia. May 2009.
92. C Chiappe, F D'Andrea. *Tecniche spettroscopiche e identificazione di composti organici*. s.l.: ETS, 2005.
93. B Stuart. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. s.l.: Wiley, 2004.
94. *Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials*. M J Baker et al. Aug 2014, *Nat Protoc*, 9(8):1771-91.
95. *Clinical applications of infrared and Raman spectroscopy: state of play and future challenges*. M J Baker et al. 2018, *Analyst*, 143, 1735-1757.
96. *Investigation of human pancreatic cancer tissues by Fourier Transform Infrared Hyperspectral Imaging*. V Notarstefano et al. Oct 2019, *Journal of Biophotonics*, 13(4)1-10.
97. *Infrared spectra of primary melanomas can predict response to chemotherapy: The example of dacarbazine*. N Wald, Y Le Corre, L Martin, V Mathieu, E Goormaghtigha. Feb 2016, *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 1862(2):174-181.
98. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Cancer Screening and Diagnostic Tool: A Review and Prospects*. K-Y Su, W-L Lee. Jan 2020, *Cancers (Basel)*, 12(1): 115.
99. *Application of Raman Spectroscopy and Infrared Spectroscopy in the Identification of Breast Cancer*. J Depciuch et al. Feb 2016, *Appl Spectrosc*, 70(2):251-63.

100. *FPA-FTIR Microspectroscopy for Monitoring Chemotherapy Efficacy in Triple-Negative Breast Cancer*. I Zawlik, E Kaznowska, J Cebulski, M Kolodziej, J Depciuch, J Vongsvivut, M Cholewa. Nov 2016, *Sci Rep*, 6:37333.
101. *Plasma membrane proteins: A new probe for the characterization of breast cancer*. H M Fahmy, A M Ismail, A S El-Feky, E S Abu Serea, W M Elshemey. Oct 2019, *Life Sci*, Vol. 234:116777.
102. *Microimaging FT-IR spectroscopy on pathological breast tissues*. J Anastassopoulou, E Boukaki, C Conti, P Ferraris, E Giorgini, C Rubini, S Sabbatini, T Theophanides, G Tosi. 2009, *Vibrational Spectroscopy*, Vol. 51, p. 270–275.
103. *Change in the microenvironment of breast cancer studied by FTIR imaging*. S Kumar, C Desmedt, D Larsimont, C Sotiriou, E Goormaghtigh. Jul 2013, *Analyst*, 138(14):4058-65.
104. *A FTIR imaging characterization of fibroblasts stimulated by various breast cancer cell lines*. S Kumar, T S Shabi, E Goormaghtigh. Nov 2014, *PLoS One*, Vol. 9(11):e111137.
105. *Application of FT-IR spectroscopy on breast cancer serum analysis*. F Elmi, A F Movaghar, M M Elmi, H Alinezhad, N Nikbakhsh. 2017, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular*, Vol. 187, p. 87–91.
106. *Breast cancer detection by ATR-FTIR spectroscopy of blood serum and multivariate data-analysis*. V E Sitnikova, M A Kotkova, T N Nosenko, T N Kotkova, D M Martynova, M V Uspenskaya. Jul 2020, *Talanta*, Vol. 214:120857.
107. *Spectrochemical analysis of liquid biopsy harnessed to multivariate analysis towards breast cancer screening*. D L D Freitas et al. Jul 2020, *Sci Rep*, 10(1):12818.
108. *In situ research and diagnosis of breast cancer by using HOF-ATR-FTIR spectroscopy*. Y Lu, Y Zhao, Y Zhu, X Xu, J Yin. Jul 2020, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, Vol. 235:118178.

109. *Monitoring breast cancer treatment using a Fourier transform infrared spectroscopy-based computational model.* J Depciuch, E Kaznowska, S Golowski, A Kozirowska, I Zawlik, M Cholewa, K Szmuc, J Cebulski. 2017, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 143, p. 261-268.
110. *Prostate and breast cancer cells death induced by xanthohumol investigated with Fourier transform infrared spectroscopy.* B Gieroba et al. Apr 2020, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, Vol. 231:118112.
111. *Fourier transform infrared spectroscopy based spectral biomarkers of metastasized breast cancer progression.* S Kar, D R Katti, K S Katti. Feb 2019, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*, 208:85-96.
112. *The Spectroscopic Similarity between Breast Cancer Tissues and Lymph Nodes Obtained from Patients with and without Recurrence: A Preliminary Study.* J Depciuch, A Stanek-Widera, N Khinevich, H V Bandarenka, M Kandler, V Bayev, J Fedotova, D Lange, J Stanek-Tarkowska, J Cebulski. Jul 2020, *Molecules*, Vol. 25(14):3295.
113. *Characterization of inflammatory breast cancer: a vibrational microspectroscopy and imaging approach at the cellular and tissue level.* H T Mohamed et al. 2018, *Analyst*, Vol. 143, p. 6103–6112.
114. *Infrared Microspectroscopy and Imaging Analysis of Inflammatory and Non-Inflammatory Breast Cancer Cells and Their GAG Secretome.* H T Mohamed et al. Sep 2020, *Molecules*, 25(18):4300.
115. *Investigation of the Effect of PD-L1 Blockade on Triple Negative Breast Cancer Cells Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy.* M H M Ali et al. Sep 2019, *Vaccines*, 7(3): 109.
116. *Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy.* K Belbachir, R Noreen, G Gouspillou, C Petibois. Oct 2009, *Anal Bioanal Chem*, 395(3):829-37.
117. *Fourier transform infrared conformational investigation of type I collagen aged by in vitro induced dehydration and non-enzymatic glycation treatments.* M G Bridelli, C Stani, R Bedotti. 2017, *J. Biol. Res.* 90, 45–50.

118. *Vibrational mapping of sinonasal lesions by Fourier transform infrared imaging spectroscopy*. E Giorgini et al. Dec 2015, *J. Biomed. Opt.* 20, 125003.
119. *Fourier Transform Infrared Imaging analysis of dental pulp inflammatory diseases*. E Giorgini et al. May 2017, *Oral Dis.* 23, 484–491.
120. *Exploiting fourier transform infrared and Raman microspectroscopies on cancer stem cells from oral squamous cells carcinoma: new evidence of acquired cisplatin chemoresistance*. V Notarstefano, S Sabbatini, C Pro, A Belloni. 2020, doi:10.1039/d0an01623c.
121. *Hyperspectral characterization of the MSTO-211H cell spheroid model: A FPA–FTIR imaging approach*. V Notarstefano et al. 2021, *Clin. Spectrosc.* 3, 100011.
122. *Cytotoxic Effects of 5-Azacytidine on Primary Tumour Cells and Cancer Stem Cells from Oral Squamous Cell Carcinoma: An In Vitro FTIRM Analysis*. V Notarstefano et al. 2021, *Cells*, 10(8), 2127.
123. *Simultaneous FTIR and Raman Spectroscopy in Endometrial Atypical Hyperplasia and Cancer*. E Barnas et al. 2020, *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–13.