

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

***Corso di Laurea Magistrale in Biologia***

***curriculum Biomedico-Biomolecolare***

ELABORATO FINALE

**Caratterizzazione fenotipica delle Cellule Mieloidi soppressorie (MDSC) e  
linfociti T senescenti ed esausti nel sangue periferico di pazienti con cancro al  
seno in trattamento neoadiuvante: *from the bench to bed***

Relatore: Prof.ssa Valentina Audrito

Correlatore: Prof.ssa Alessandra Gennari

Candidato: Paolo Pagani

Matricola: 20033996

***Anno accademico 2023/2024***

<b>1. Introduzione .....</b>	<b>4</b>
1.1 Tumore al seno .....	4
1.2 Fattori di rischio.....	8
1.3 Metodologie Diagnostiche per il Cancro al Seno .....	10
1.4 Patogenesi del cancro al seno .....	14
1.4.a Stadiazione del tumore al seno .....	16
1.5 Sottotipi molecolari del cancro al seno.....	19
1.6 Carcinoma Mammario in Stadio Precoce. ....	25
1.6.a Opzioni terapeutiche. ....	26
1.7 Sistema immunitario, Linfociti T e Senescenza.....	30
1.7.a Linfociti T.....	31
1.7.b Cellule Senescenti.....	33
1.7.c Linfociti T senescenti .....	37
1.7.d Cellule Esauste .....	38
1.7.e Linfociti T esausti .....	38
1.8 MDSC .....	40
1.9 Correlazione tra cellule T senescenti e cellule soppressorie di derivazione mieloidi (MDSC) nel contesto del microambiente tumorale (TME).....	43
<b>2. Scopo dell'elaborato.....</b>	<b>44</b>
<b>3. Materiali e Metodi.....</b>	<b>45</b>
3.1 Reclutamento dei pazienti .....	45
3.2 Procedura di raccolta e trasporto dei campioni biologici .....	48
3.3 Citofluorimetria .....	50
3.4 Staining dei linfociti T senescenti ed esausti .....	55
3.5 Gating strategy linfociti T senescenti ed esausti .....	59
2.6 Isolamento di Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs).....	63

3.7 Staining di Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSCs) .....	66
3.8 Gating strategy per MDSCs .....	68
3.9 Analisi statistiche .....	70
3.10 Ritiro del paziente dallo studio: .....	70
<b>4. Risultati</b> .....	<b>71</b>
4.1 Tabella descrittiva della popolazione in studio. ....	71
4.2 Caratterizzazione dei linfociti T senescenti ed esausti nei pazienti con tumore al seno prima dell'inizio della terapia ( <i>baseline</i> ) .....	73
4.3 Confronto della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T senescenti ed esausti nei due gruppi di pazienti pCR vs RD. ....	78
4.4 Valutazione della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T senescenti ed esausti prima e dopo la terapia .....	86
4.5 Analisi delle sottopopolazioni di MDSC prima dell'inizio della terapia nei sottotipi tumore al seno .....	105
4.6 Valutazione della frequenza delle sottopopolazioni di cellule MDSC prima e dopo la terapia. ....	107
<b>5. Discussione</b> .....	<b>111</b>
<b>6. Sitografia</b> .....	<b>116</b>

# 1. Introduzione

## 1.1 Tumore al seno

Il carcinoma alla mammella è il tumore più comune a livello femminile e rappresenta circa il 30% sul totale dei tumori che colpiscono le donne. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), nel 2020 sono stati diagnosticati circa 2,3 milioni di nuovi casi di cancro al seno e si stima che abbia causato oltre 685.000 decessi in tutto il mondo. <sup>1</sup>

In Italia, ad oggi, il cancro al seno è una delle principali cause di mortalità tra le donne. Facendo riferimento ai dati dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), nel 2020 sono stati stimati circa 53.000 nuovi casi di cancro al seno nel paese. Questi numeri riflettono un aumento dell'incidenza del cancro al seno in Italia, e anche a livello mondiale, negli ultimi decenni, che è in parte attribuibile all'invecchiamento della popolazione dovuta ad un aumento della durata della vita media, ma anche all'adozione di nuovi stili di vita ed ai progressi nella diagnosi precoce e nel rilevamento della patologia stessa in fasi embrionali della malattia. <sup>1</sup>

Nonostante la sua forte incidenza, il cancro al seno è uno dei tumori più trattabili, con buone possibilità di efficacia completa del piano terapeutico soprattutto se diagnosticato nelle fasi più precoci della malattia anche grazie ad una serie di terapie standardizzate con alta percentuale di esito positivo ed a delle campagne di screening che permettono di individuare sul nascere la patologia.

Esistono grandi differenze tra i diversi Paesi del mondo per quanto riguarda il cancro al seno, la percentuale di tumori alla mammella diagnosticati quando la malattia si è già diffusa nell'organismo è più alta nei Paesi a basso reddito e tra le donne più anziane con un basso stato socioeconomico.

La più bassa percentuale di casi di tumore metastatico è stata diagnosticata in Nord America, in Europa e in Oceania, mentre le più alte in America centrale e Sud America, nell'Africa sub-sahariana e nell'Asia centrale e occidentale. <sup>2</sup>

Dalla fine degli anni Novanta a livello italiano si è osservata una continua tendenza alla diminuzione della mortalità per carcinoma mammario (-0,8%/anno), attribuibile ad una maggiore diffusione dei programmi di diagnosi precoce ed anche ai progressi terapeutici.

La mortalità del tumore al seno è diminuita del 41% rispetto ai dati del 1989 a livello mondiale, il dato è però fortemente influenzato dal progresso tecnologico e terapeutico della medicina, dalle campagne di screening e dalle metodologie diagnostiche precoci presenti nei paesi più sviluppati mentre nei paesi meno sviluppati la situazione è leggermente migliorata grazie all'aiuto di Stati più avanzati ed organizzazioni a scopo benefico ma, ad oggi è una delle maggiori cause di morte a livello oncologico a causa delle disuguaglianze.

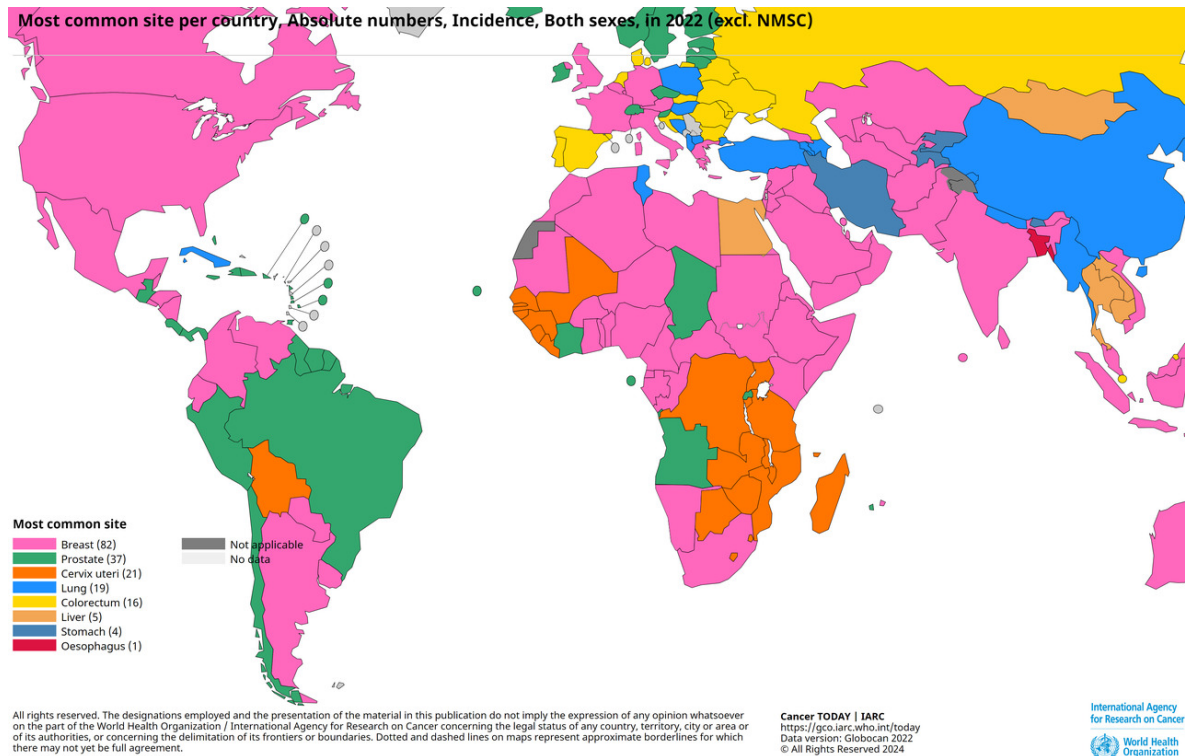


Figura 1 incidenza delle patologie Oncologiche a livello mondiale in ogni paese, in Rosa il tumore al seno. Fonte: International Agency for Research on Cancer- WHO.

Il tumore al seno è uno dei tumori più impattanti a livello mondiale sia per incidenza che per mortalità. Il primo passo per comprendere le possibili alterazioni che possono colpire la mammella è indagarne la struttura anatomica. Questo ci permette di interpretare eventuali sintomi o disfunzioni e di attivare un campanello d'allarme nel caso di sospetto di patologia.

La mammella nell'uomo è normalmente divisa in due componenti anatomiche principali: il parenchima ed il tessuto connettivo.

Il parenchima è costituito dalle ghiandole mammarie, responsabili della produzione di latte sotto la stimolazione dell'ormone ipofisario prolattina. Queste ghiandole sono organizzate in una struttura a forma di grappolo, note come lobuli, che sono collegate a loro volta ai dotti ghiandolari. I dotti hanno la funzione di trasporto del latte prodotto ai capezzoli, che ne permettono la successiva fuoriuscita del materiale biologico. Il tessuto connettivo fornisce il supporto strutturale alla mammella ed include al suo interno adipe, vasi sanguigni e linfatici, così come nervi. Un altro elemento chiave dell'anatomia della mammella è il sistema linfatico, che svolge un ruolo cruciale nel drenaggio dei fluidi e nel mantenimento della salute del seno. Nel sistema linfatico troviamo anche diversi linfonodi, distribuiti in tutto il tessuto mammario e lungo la parete toracica. La quantità di tessuto adiposo nel seno della donna è soggettiva e varia con l'età, ne definisce spesso l'architettura e l'aspetto, generalmente nelle persone anziane è maggiore rispetto a quelle giovani.<sup>3</sup>

La ghiandola mammaria poggia sul muscolo grande pettorale che da struttura e sostegno e viene anatomicamente suddivisa in quattro quadranti, due superiori e due inferiori.

L'anatomia del seno di ogni donna ha caratteristiche personali sia nella forma, sia nella dimensione che nella simmetria. La forma del seno dipende soprattutto dalla presenza e dalla eventuale distribuzione dell'adipe nel tessuto.

Donne con seno grande e quelle con seno piccolo possono avere le stesse possibilità di allattare perché il volume della mammella è indipendente dalla sua funzionalità, così come dalle possibilità di sviluppare una patologia.

Il tumore al seno può svilupparsi da vari tipi di tessuto all'interno della mammella, ma la crescita incontrollata delle cellule avviene con maggiore frequenza nella porzione duttale e con meno frequenza in quella lobulare e connettivale.<sup>3, 4</sup>

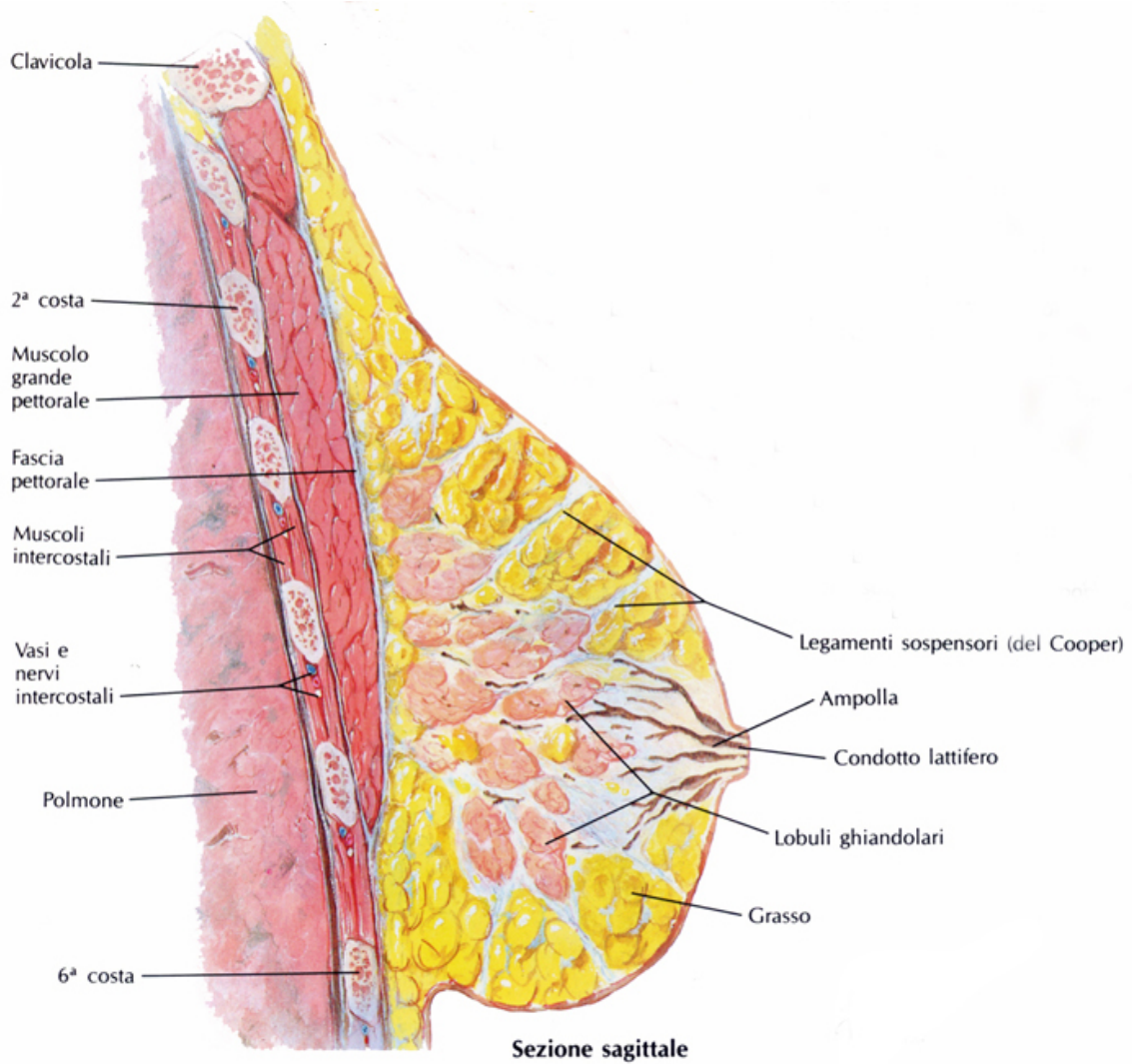


Figura 2 anatomia del seno in sezione saggitale, Fonte: senologia.it

## **1.2 Fattori di rischio**

L'eziologia del carcinoma mammario è complessa e multifattoriale, comprende una combinazione di fattori genetici, ambientali e comportamentali. Non tutti i fattori di rischio hanno la stessa incidenza in percentuale sulla probabilità di sviluppare il tumore. Alcuni fattori di rischio hanno un impatto significativo altri più lievi ed alcuni moderati.<sup>3,4</sup>

Fattori di rischio significativi:

- **Storia personale:** una donna che ha già avuto un tumore ad un seno ha un rischio di 3-4 volte superiore di sviluppare una nuova neoplasia nello stesso seno o nell'altro, non correlato al tumore primitivo (non si tratta infatti di una recidiva del precedente tumore, ma di un altro carcinoma). Inoltre, per questa tipologia di pazienti rimane sempre il rischio di una possibile recidiva tumorale.
- **Storia familiare diretta:** un parente di primo grado (madre, sorella, figlia) affetto da carcinoma della mammella raddoppia il rischio di sviluppare la malattia.
- **Genetica:** si stima che il 5-10% dei casi del cancro al seno siano di origine genetica. Le donne che ereditano la mutazione a carico del gene BRCA1 hanno circa il 45-60% di probabilità (contro il 10% della popolazione generale) di sviluppare una neoplasia mammaria e il 20-40% (rispetto all'1-2% della popolazione generale) di sviluppare un tumore ovarico nell'arco della vita. Le percentuali sono inferiori nel caso di mutazione del gene BRCA2, rispettivamente, 25-40 e 10-20%
- **Ambiente:** l'inquinamento dell'aria può favorire il cancro al seno. Donne che risiedono e lavorano in luoghi con livelli più elevati di particelle sottili nell'aria hanno infatti maggiori probabilità di contrarre il cancro al seno rispetto a coloro che vivono e lavorano in aree meno inquinate secondo i dati di presentati dal Franck Crick Institute di Londra all' ESMO di Madrid 2023; i risultati hanno mostrato che il rischio di cancro al seno è aumentato del 28% quando l'esposizione all'inquinamento atmosferico da particelle fini (PM 2,5) aumenta di 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , che equivale alla differenza di concentrazione che si rileva passando da aree rurali a quelle urbane. Aumenti minori del rischio di cancro al



seno sono stati registrati anche nelle donne esposte a livelli elevati di inquinamento atmosferico da particelle più grandi (PM10 e biossido di azoto).<sup>5</sup>

Fattori di rischio lievi:

- **Età:** con l'età aumenta anche il rischio. Circa il 77% delle donne con diagnosi di cancro della mammella hanno più di 50 anni e almeno il 50% del totale precedente sono over 65 anni. Le donne di età compresa tra 40 e 50 anni hanno un rischio di sviluppare cancro al seno di circa 1.4% basandosi esclusivamente sull'età come unico fattore di rischio, aumenta a 3% tra i 50-60 anni, e diventa di 3.7 % tra 60 e 70 anni, mentre nelle donne over 70 il rischio è di 4% o leggermente maggiore.

Fattori di rischio moderati:

- **Storia familiare non diretta:** riguarda casi oncologici al seno sviluppato in parenti di secondo o terzo grado.
- **Peso:** il sovrappeso insieme ad una dieta poco corretta accresce il rischio oncologico, in particolare l'eccessiva presenza di tessuto lipidico nella zona addominale aumenta la presenza di componenti infiammatorie e di conseguenza il rischio, in particolare dopo la menopausa.
- **Assenza di attività fisica e sedentarietà:** incrementa di circa del 10% il rischio di patologia.
- **Esposizione eccessiva a radiazioni:** nelle donne che hanno subito un trattamento di radioterapia mediastinica per linfomi trattati prima dei 30 anni, hanno un maggiore rischio di sviluppare un carcinoma mammario nel corso della vita aumenta.
- Familiarità per carcinoma ovarico, pancreas o melanoma
- **Ereditarietà:** donne discendenti da popolazioni ebraiche provenienti dall'Europa Centrale e Orientale, hanno un rischio maggiore di sviluppare la malattia.
- **Razza:** le donne caucasiche hanno un rischio leggermente maggiore di sviluppare la patologia oncologica alla mammella rispetto alle donne afroamericane, asiatiche, ispaniche e native americane. Prima dei 40 anni il rischio è uguale per ogni razza.<sup>3</sup>

- **Terapia ormonale sostitutiva (TOS):** l'assunzione prolungata di estrogeni e progesterone concorre per essere uno dei più importanti fattori di rischio, soprattutto per le donne che sono state sottoposte a terapie croniche. Il rischio diminuisce sensibilmente dopo cinque anni dalla sospensione della terapia e ritorna sugli standard normali.
- **Densità del tessuto mammario:** Le donne con una maggiore densità del tessuto mammario possono avere un rischio leggermente maggiore.

Non fanno invece parte dei fattori di rischio, neanche lievi o moderati, la mastopatia fibrocistica né gravidanze multiple o aborti che, erroneamente spesso vengono associati al cancro al seno. <sup>4</sup>

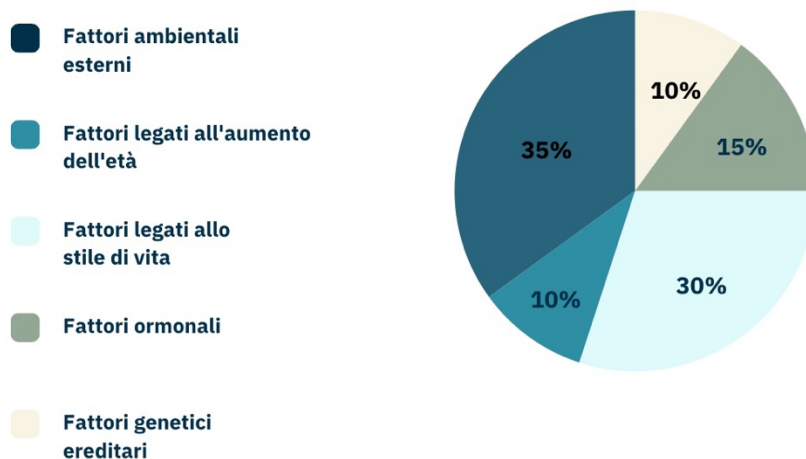


Figura 3 Fattori di rischio in percentuale per il carcinoma alla mammella. Fonte: AIOM

### **1.3 Metodologie Diagnostiche per il Cancro al Seno**

La patologia del cancro al seno viene prevalentemente diagnostica per mezzo di una serie di metodiche che vengono definite “diagnostica per immagini”, le due tecniche più utilizzate sono la Mammografia e l’Ecografia, ma anche la risonanza magnetica può essere utilizzata in casi più dubbi come lesioni sospette oppure nel caso la paziente abbia mammelle con elevata densità e siano difficoltose le procedure citate precedentemente al fine della diagnosi. <sup>1</sup>

La **mammografia** è una procedura di *imaging* medico utilizzata per esaminare il tessuto mammario al fine di individuare anomalie o segni di patologie.

Nella procedura della mammografia, il seno viene compresso tra due piastre piatte mentre viene eseguita un'immagine a raggi X. Questa compressione aiuta a distribuire uniformemente il tessuto mammario, riducendo la dose di radiazioni necessaria per ottenere una visualizzazione di alta qualità e consentendo la visualizzazione chiara delle eventuali anomalie senza un rischio eccessivo per chi si sottopone all'esame.

La mammografia ad oggi è il test di screening per eccellenza per poter identificare la presenza di eventuali tumori alla loro più precoce manifestazione, è infatti particolarmente efficace nella rilevazione di piccoli noduli o calcificazioni, che possono essere segni precoci di tumori al seno ed è l'esame, infatti, che viene utilizzato nelle campagne di prevenzione.

Questa tecnica non ha particolari controindicazioni e non ha dei limiti di età per potersi sottoporre a questa metodica è consigliata anche per le donne sopra i 70 anni previa identificazione del loro stato di salute. Nelle donne sotto i 40-45 anni di età, in alcune pazienti a causa della densità della ghiandola, questa indagine può risultare poco leggibile, nelle pazienti più giovani viene consigliata l'ecografia nel caso in cui la mammografia non sia facilmente interpretabile.

L'**ecografia** è anch'essa una procedura di *imaging* medico non invasiva utilizzata per esaminare il seno. Questa tecnica si basa sull'utilizzo di onde sonore ad alta frequenza che vengono emesse da una sonda elettromagnetica e poi riflessa dai tessuti del seno per creare un'immagine in tempo reale valutabile tramite il monitor dello strumento, l'ecografo.

È una procedura utile in quanto permette di discriminare la componente di tessuto liquida e solida del seno, aiutando il medico curante nell'individuazione di eventuali masse o strutture anomale che richiedono esami più approfonditi o solamente delle cisti benigne.

Come la mammografia, è un ottimo esame di *screening* ma con delle limitazioni, in quanto questa metodologia non riesce a identificare tutte le anomalie, soprattutto le più ridotte, inoltre il test è dipendente sia dalla capacità e sia dalla esperienza del medico che svolge l'esame. <sup>1,3</sup>

L'eventuale identificazione di noduli o formazioni sospette porta all'esame del tessuto mediante biopsia.

La **biopsia** alla mammella è una procedura medica utilizzata per diagnosticare le anomalie del tessuto. Attraverso questa procedura, i medici e gli altri operatori sanitari specializzati sono in grado di raccogliere campioni di tessuto per eseguire analisi che forniscono informazioni cruciali per la diagnosi e il trattamento del carcinoma mammario, sia sotto il profilo istologico, sia citologico che biologico-molecolare.

La biopsia può essere effettuata mediante differenti procedure; è possibile effettuare l'esame mediante aspirazione con ago sottile (FNAB), mediante escissione con ago (CNB) oppure con un'operazione chirurgica aperta. Ogni metodica permette di avere campioni tessuto differenti.

Dal campione che si ricava si possono effettuare diverse tipologie di analisi:

1. **Istologica:** analisi di sezioni sottili di tessuto con l'ausilio del colorante vengono osservate al microscopio per evidenziare eventuali alterazioni tissutali e cellulari.
2. **Immunochimica:** utilizzata per identificare proteine presenti nelle cellule neoplastiche. È utile per differenziare tra diversi tipi di tumori e nel determinare il loro grado di aggressività in base alla componente proteica al suo interno.
3. **Genetica:** analisi con la funzione di individuare eventuali mutazioni associate al carcinoma mammario di tipo ereditario come BRCA 1 e BRCA2, utili soprattutto per una eventuale consulenza genetica.
4. **Receptor testing:** test che hanno la funzione di specificare il sottotipo molecolare del tumore per determinarne il trattamento ottimale perché alcune neoplasie rispondono più o meno positivamente alla terapia ormonale in base al loro sottotipo oppure per terapie mirate anti-HER2 come il farmaco trastuzumab. Altri recettori che vengono sottoposti ad analisi sono gli ormonali di estrogeni ER e di progesterone PR, in quanto essi permettono come HER2 di valutare la terapia migliore per il paziente perché una positività a questa analisi permette di somministrare con esito positivo una terapia ormonale e quindi il paziente avere un *outcome* prognostico migliore.

5. **Biomarcatori di prognosi:** alcuni biomarcatori possono essere analizzati nell'ottica della recidiva o della prognosi del tumore. I biomarcatori possono essere sia specifiche proteine sia mutazioni genetiche. Un esempio di essi può essere l'indice di proliferazione cellulare Ki-67 che fornisce informazioni riguardo la velocità di crescita e di espansione del tumore, più questo valore è alto, più il tumore sarà aggressivo ed il paziente avrà prognosi peggiore. Già citati precedentemente sono i recettori ormonali ER e PR contribuiscono anch'essi alla valutazione prognostica sotto il punto di vista terapeutico.

Le analisi effettuate tramite biopsia alla mammella forniscono quindi delle informazioni fondamentali per la diagnosi, la prognosi e la pianificazione del trattamento del carcinoma mammario.

La combinazione delle diverse tecniche di analisi, che comprendono l'istologia, l'immunochimica, l'analisi genetica e il testing dei recettori, consente una valutazione completa a 360° del tessuto tumorale, del quadro generale del paziente, della possibilità terapeutica e dell'*outcome* prognostico del paziente, permettendo ai professionisti sanitari di personalizzare il trattamento per ciascun paziente in base alle caratteristiche specifiche.

Una volta stabilita la presenza di una massa neoplastica, si approfondisce ulteriormente la valutazione della presenza di eventuali masse tumorali già diffuse in altre porzioni corporee mediante altre tecniche diagnostiche come la radiografia del torace, ecografia, tomografia computerizzata (TC), scintigrafia ossea o tomografia a emissione di positroni (PET).<sup>1,3</sup>

## 1.4 Patogenesi del cancro al seno

Il cancro al seno si può suddividere in diverse sottocategorie in base alle aree anatomiche come lobuli, i dotti o il tessuto intermedio tra i distretti anatomici.<sup>6</sup>

Grazie a quest'ultima distinzione possiamo denominare il tumore in **carcinoma** se si origina dal tessuto epiteliali della porzione lobulare o duttale del seno mentre, si definisce **sarcoma** quando la formazione neoplastica ha origine dal tessuto connettivo che circonda e sostiene i dotti e lobuli. Il tessuto che compone la mammella ha un'architettura molto complessa, con all'interno diverse tipologie cellulari. È un organo complesso deputato prevalentemente alla produzione di latte per il periodo dell'allattamento. Per questa sua capacità secretiva è anche denominato "ghiandola mammaria". Il tessuto ghiandolare mammario in età adulta è composto da circa 15 a 20 lobi per mammella, ogni lobo si compone di molte strutture sacciformi, chiamate lobuli che, durante l'allattamento, producono il latte.<sup>6</sup>

Il tessuto nel corso del tempo cambia strutturalmente con la maturazione della donna ed è ad elevato turn-over cellulare per garantire la sua funzione ghiandolare per tutto il corso della vita. All'interno di questa struttura, quindi, inseriscono anche delle cellule staminale con la funzione di garantire un ricambio cellulare adeguato alla sua funzione. Queste cellule potrebbero guidare l'inizio dello sviluppo del tumore alla mammella perché subiscono delle mutazioni che riguardano la proliferazione e la sopravvivenza; quindi, che possono coinvolgere sia oncogeni con un "*gain of function*" ed oncosoppressori con una "*loss of function*", alcune di esse possono essere:

- **Wnt/ $\beta$ -catenina:** coinvolti nella proliferazione cellulare, regolazione del ciclo cellulare, differenziazione cellulare, adesione cellulare e morfogenesi e sviluppo embrionale.
- **CDK (proteine chinasi ciclina dipendenti):** hanno un ruolo di regolazione del ciclo cellulare, regolazione della trascrizione genica, controlli *checkpoint* del DNA, regolazione del processo apoptotico.
- **NOTCH:** coinvolta nello sviluppo embrionale, proliferazione e differenziazione cellulare, adesione cellulare e morfogenesi, differenziazione delle cellule del sistema immunitario.
- **PI3K/AKT/mTOR:** geni coinvolti nella regolazione della crescita cellulare, nella sopravvivenza, angiogenesi e metabolismo in particolare quello lipidico.

Una cellula mutata *driver*, che ha un comportamento maligno può, condurre quindi ad un carcinoma in situ (maligno) nelle porzioni anatomiche citate precedentemente, che in base alla loro posizione vengono classificate in:

- carcinoma duttale in situ (DCIS).
- carcinoma lobulare in situ (LCIS).

Il carcinoma in situ per definizione non invade le altre componenti cellulari adiacenti e le membrane basali.

Il carcinoma in situ, può evolversi nel tempo in un cancro più aggressivo, le cellule possono invadere la membrana basale sottostante al tessuto ed essi vengono definiti rispettivamente IDC e ILC. Successivamente, il tumore può anche raggiungere la componente circolatoria e/o linfatica per poi metastatizzare nelle diverse porzioni corporee, sia vicine alla zona iniziale del tumore come i linfonodi sotto ascellari o in siti distanti come polmoni, fegato, ossa e cervello aggravando il quadro patologico e la prognosi del paziente. Inoltre, anche se la neoplasia primaria viene rimossa, alcune cellule microscopiche possono rimanere infiltrate nei tessuti corporei adesi alla massa, dando possibilità di recidiva tumorale anche ad anni di distanza.<sup>6,7</sup>

### **1.4.a Stadiazione del tumore al seno**

Si utilizza un sistema universale, la classificazione **TNM** (*tumor, node, metastasis*), per descrivere l'estensione anatomica del tumore, per la funzione sia prognostica che predittiva.

Questo sistema fornisce una valutazione dettagliata del tumore primario T, dell'eventuale coinvolgimento linfonodale N e della presenza di eventuali metastasi M. È quindi un sistema composto da tre componenti fondamentali <sup>8</sup>:

1. **T** (Tumore Primario): questa categoria descrive le dimensioni del tumore primario e la sua estensione nell'organo e nel tessuto adiacente ad esso. La classificazione va da T0 (nessun segno tumorale) a T4 (presenza ed estensione significativa del tumore).
2. **N** (Noduli Linfatici Interessati): questa categoria indica se il tumore è diffuso ai linfonodi e nel caso li avesse raggiunti, quanti linfonodi sono interessati. La categoria include N0 (nessun coinvolgimento linfonodale) a N1-N3 (coinvolgimento linfonodale crescente).
3. **M** (Metastasi): M0 indica l'assenza di metastasi mentre, M1 indica la presenza di metastasi.

La classificazione TNM è fondamentale per la stadiazione del cancro e per guidare le decisioni di trattamento. Le informazioni fornite dalla classificazione TNM aiutano i medici a determinare il corretto approccio terapeutico e a prognosticare il decorso della malattia.



In particolare, il cancro al seno può essere classificato da 0 a 4 stadi in base ai criteri stabiliti da AIOM per le condizioni di T, N, M (associazione Italiana Oncologia Medica) nel 2021. <sup>2,9</sup>

- **Stadio 0:** tumore non invasivo circoscritto alla mammella.
- **Stadio 1:** tumore di piccole dimensioni e circoscritto al tessuto mammario o evidenza di cancro nei linfonodi vicini alla mammella. Può avere già delle microinvasioni nella membrana basale circostante.
- **Stadio 2:** definisce un cancro invasivo con interessamento da 1 a 3 linfonodi ascellari.
- **Stadio 3:** descrive un cancro invasivo con interessamento da 4 a 6 ascellari o linfonodi non ascellari, alla cute della mammella o alla parete toracica.
- **Stadio 4:** descrive un quadro metastatico

Tabella 1 Tabella associata al cancro alla mammella.

STADIO	TUMORE	LINFONODI	METASTASI
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IIA</b>	T0	N1	M0
	T1	N1	
<b>IIB</b>	T0	N1	M0
	T1	N1	
	T2	N0	
<b>IIIB</b>	T2	N0	M0
	T3	N1	
<b>IIIA</b>	T0	N2	M0
	T1	N2	
	T2	N2	
	T3	N1	
	T4	N2	
<b>IIIB</b>	T4	N0/1/2	M0
<b>IIIC</b>	Any T	N3	M0
<b>IV</b>	Any T	Any N	M1

Un altro parametro per descrivere e classificare il tumore è il **Grading tumorale**, ovvero la valutazione della proliferazione e della de-differenziazione della cellula tumorale rispetto ai tessuti sani circostanti. È un sistema fondamentale che fornisce informazioni sul comportamento tumorale. Il *grading* sia nel caso del tumore alla mammella, ma in generale nell'ambito oncologico, aiuta per la prognosi e per la scelta terapeutica. <sup>4</sup>

Il sistema di *grading* si basa su 3 parametri fondamentali che permettono al patologo di classificare la cellula neoplastica da G1 a G3 che sono:

1. Architettura della cellula tumorale rispetto ad un confronto con una cellula sane dello stesso tessuto.
2. Valutazione nucleare
3. Valutazione della attività e velocità mitotica.

Il patologo, dopo una valutazione attenta dei tre parametri emette un referto con il *Grading* tumorale, che può essere:

- **Grado I:** la cellula tumorale si presenta ben differenziata con le caratteristiche proprie del tessuto a cui appartiene ed ha ancora una attività proliferativa limitata.
- **Grado II:** la cellula neoplastica è leggermente regredita in termini di differenziazione ma ha alzato il suo grado di proliferazione.
- **Grado III:** la cellula è completamente de-differenziata con un aspetto simil-staminale ed una attività proliferativa elevatissima. <sup>9</sup>

## **1.5 Sottotipi molecolari del cancro al seno.**

Estrogeni e progesterone sono ormoni sessuali naturalmente presenti nella donna.

La crescita di alcuni tumori della mammella può essere influenzata dal punto di vista stimolatorio da estrogeni e/o progesterone; tali tipi di neoplasie esprimono un numero elevato di recettori (ER o PgR) a cui gli ormoni si legano per stimolare la crescita delle cellule cancerose. I tumori che esprimono ER vengono chiamati tumori **ER-positivi o PgR-positivi**.<sup>2</sup>

Il **recettore ER** è una proteina che si trova sulla membrana delle cellule che compongono il parenchima della mammella con una funzione fondamentale ovvero quella della regolazione della crescita e proliferazione. L'attivazione del recettore è effettuata mediante il legame con gli estrogeni ovvero i principali ormoni sessuali femminili. Il legame ormone recettore può avvenire sia a livello della membrana plasmatica sia a livello citoplasmatico. L'attivazione avviene per dimerizzazione e, una volta attivo, il dimero migra verso la porzione nucleare con diverse finalità tra cui:

- Legame agli ERE (Elementi di Risposta agli Estrogeni): si lega a specifiche sequenze di DNA chiamate ERE presenti nei promotori di geni target ormonali.
- Reclutamento dei coattivatori: il complesso recettore-ERE recluta coattivatori e altre proteine accessorie che facilitano la trascrizione dei geni target.
- Avvio della trascrizione: la RNA polimerasi II viene reclutata al sito del gene target e inizia la trascrizione dell'mRNA.
- Feedback negativo legata agli ormoni estrogeni.
- Cross talk con altri pathway.

Se questo recettore acquisisse una *gain of function* e presentasse un'attività costante e prolungata nel tempo, può influenzare lo sviluppo e la progressione neoplastica.

Il recettore ha un enorme impatto Qualora nella valutazione del cancro al seno poiché una sua eventuale positività offre all'oncologo una possibilità di scelta terapeutica con un target specifico che ha lo scopo di interferire con l'attività stimolatoria degli estrogeni che sono la causa principale della crescita neoplastica perché il recettore mutato continua ad influenzare la cellula con segnali di stimolo, di crescita e di progressione. Il farmaco può agire sia a livello recettoriale con una attività da antagonista o modulatore selettivo del recettore ma possono anche essere inibitori diretti degli enzimi come Aromatasi, coinvolti nella sintesi degli estrogeni.

L'introduzione di questi farmaci chemioterapici anti-ER+ ha rivoluzionato la gestione terapeutica dei pazienti ER+, migliorando l'efficacia della terapia, riducendo il rischio di recidiva, prolungando la sopravvivenza e migliorando la qualità di vita dei pazienti durante e dopo il trattamento chemioterapico. (Figura 4).<sup>2, 6, 8</sup>

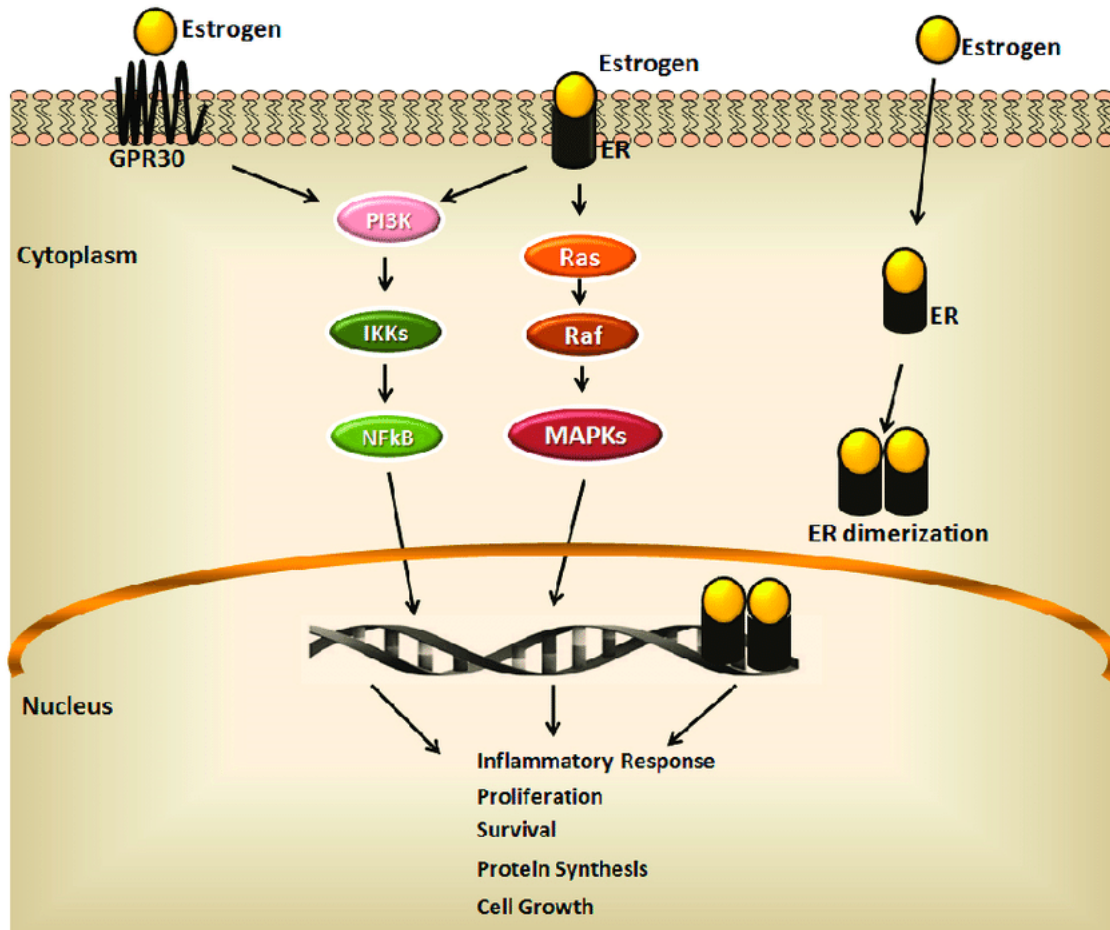


Figura 4 L'immagine illustra i meccanismi di segnalazione mediati dall'estrogeno attraverso i suoi recettori, ER e GPR30. In particolare l'ormone può legarsi al recettore ER, attivando le vie di segnalazione Ras/Raf/MAPK, che anch'esse promuovono la trascrizione di geni coinvolti in questi processi cellulari. Inoltre, l'estrogeno può legarsi al recettore ER nel citoplasma, provocando la dimerizzazione del recettore, che poi trasloca nel nucleo e si lega agli Elementi di Risposta agli Estrogeni (ERE) sul DNA, inducendo ulteriormente la trascrizione genica di target specifici. Fonte: Dimauro I, Grazioli E, Antinozzi C, Duranti G, Arminio A, Mancini A, Greco EA, Caporossi D, Parisi A, Di Luigi L,. Estrogen-Receptor-Positive Breast Cancer in Postmenopausal Women: The Role of Body Composition and Physical Exercise. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Sep 18;18(18):9834.

**Il recettore PgR** è una proteina che si trova sulla superficie delle cellule del seno ed è coinvolta nella regolazione, crescita, maturazione, architettura e sviluppo del tessuto mammario. La sua attivazione è mediata dalla sua interazione con l'ormone progesterone che causa un cambiamento conformazionale e una dimerizzazione e traslocazione a livello nucleare. Successivamente, nel nucleo, il complesso formato dal progesterone e da suo recettore lega specifiche sequenze di DNA ovvero le *Progesterone Response Elements* (PRE). Esse sono in grado di modulare l'espressione dei geni target coinvolti nell'apoptosi e la sua inibizione, nella differenziazione del tessuto mammario e della proliferazione cellulare (Figura 5). La valutazione di PgR, come quella di ER, è di cruciale importanza nell'ambito del tumore al seno perché una positività apre all'oncologo che somministra la terapia la possibilità di bloccare come negli ER positivi la crescita tumorale mediante il blocco della via ormonale del progesterone. <sup>2, 6, 8</sup>

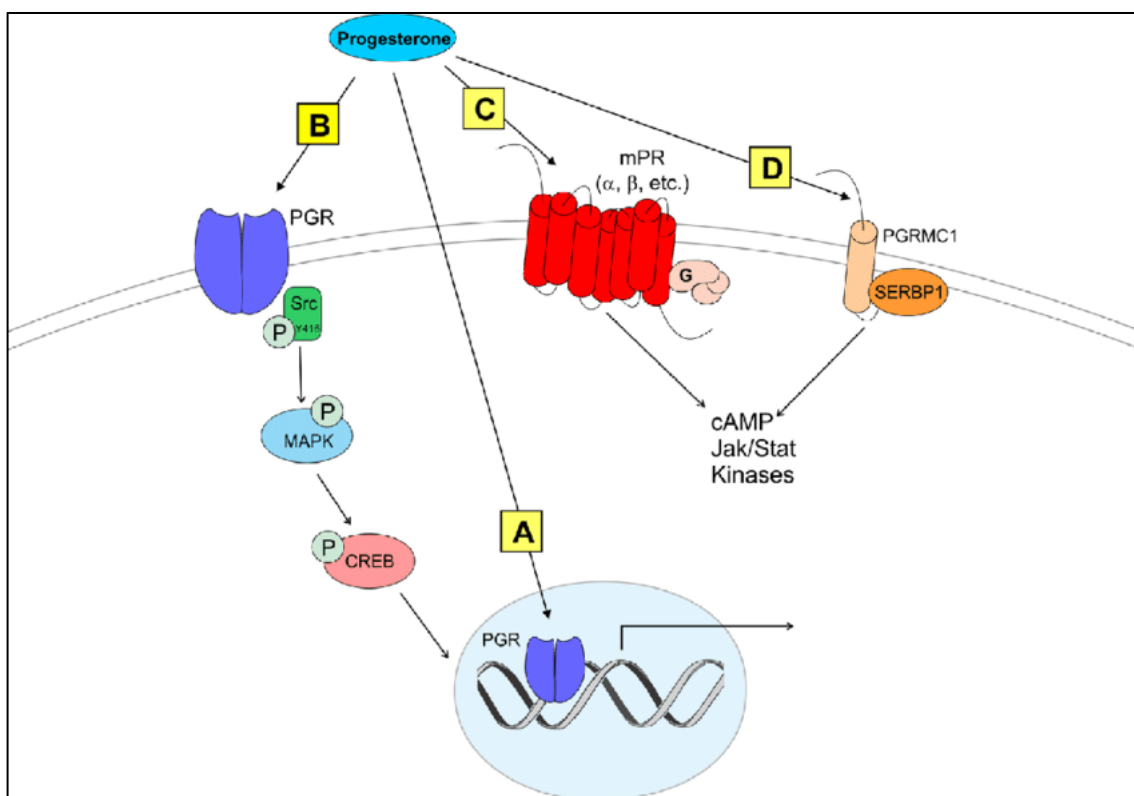


Figura 5 L'immagine illustra il pathway di segnalazione dell'ormone progesterone (PGR) ed i suoi numerosi target. L'ormone PGR lega diversi recettori tra cui il suo recettore nucleare che regola direttamente la trascrizione genica e il recettore membranale PRGr che prevede l'attivazione di una cascata di attivazione che coinvolge le proteine Src, MAPK e CREB. Il progesterone è in grado di attivare le vie di segnalazione cAMP, Jak/Stat e le chinasi tramite i recettori progestinici di membrana (mPR) e il complesso proteico PGRMC1/SERBP1. Fonte: Mittelman-Smith, Melinda & Rudolph, Lauren & Mohr, Maggie & Micevych, Paul. (2017). Rodent Models of Non-classical Progesterone Action Regulating Ovulation. *Frontiers in Endocrinology*. 8. 10.3389/fendo.2017.00165.

Sia nel caso di tumore ER negativi, PgR negativi o entrambi si ha una sfida terapeutica più ardua, poiché il tumore non risponde alle terapie convenzionali con gli inibitori ormonali, ma le opzioni più valide sono rappresentate dalla chemioterapia o /e da terapie mirate in base alle vie di segnalazione alterate nella cellula tumorale.

I recettori **HER2** sono espressi sulla superficie di tutte le cellule e sono coinvolti nei normali processi di crescita, moltiplicazione e riparazione cellulare, è il recettore del fattore di crescita epidermico umano. Il 20% circa dei tumori della mammella presenta livelli insolitamente alti di HER2 sulla superficie delle loro cellule (Fig.6).

Questi tumori vengono definiti HER2-positivi e tendono a crescere velocemente e hanno maggiori probabilità di diffondersi rispetto ai tumori della mammella HER2-negativi.

La scoperta del comportamento del tumore HER2-positivo ha avuto un impatto significativo nella gestione della malattia e nella scelta terapeutica perché mediante la terapia *target* anti-HER2 con i farmaci come trastuzumab e pertuzumab per bloccare la crescita tumorale e stimolando la risposta immunitaria intrinseca. <sup>2, 6, 8</sup>

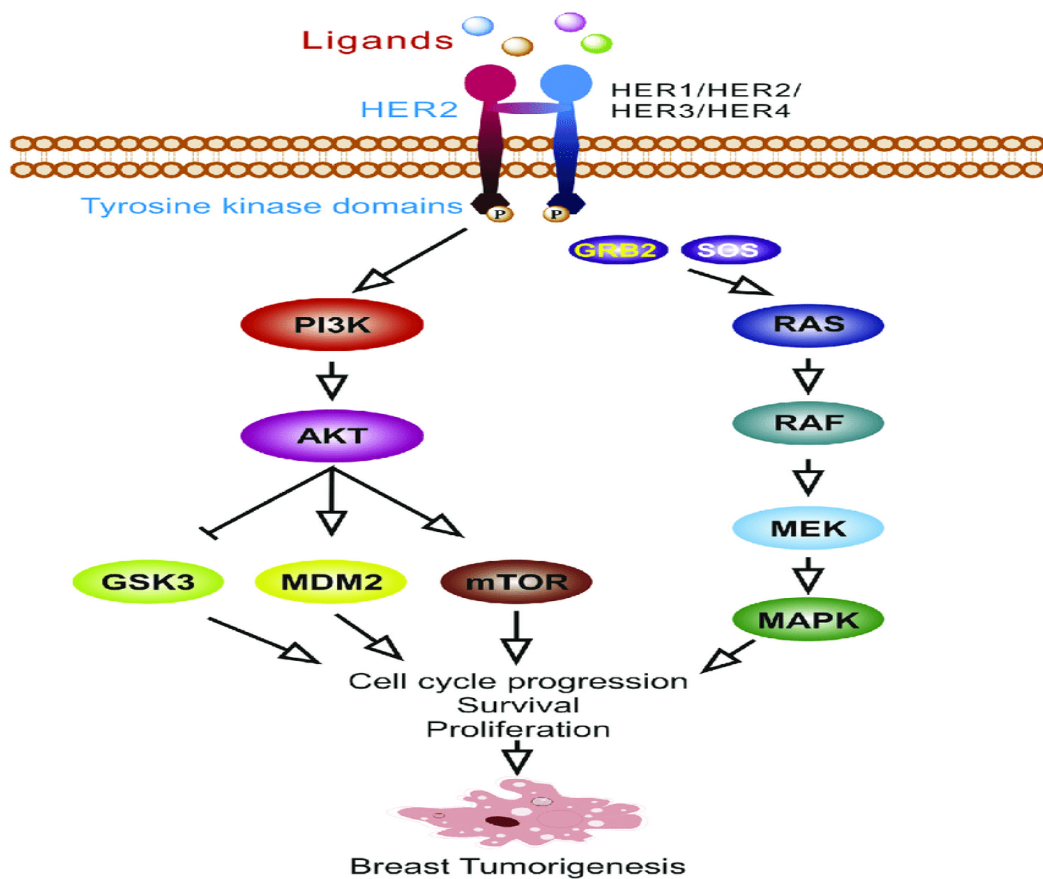


Figura 6 L'immagine descrive i pathway di segnalazione di HER2 che viene iperespressa nel carcinoma mammario e porta all'attivazione della via PI3K/AKT che influenza la sopravvivenza cellulare attraverso la regolazione di GSK3, MDM2 e mTOR. La proliferazione cellulare viene stimolata tramite la cascata di attivazione di RAS, RAF, MEK e MAPK. Fonte: Feng, Yixiao & Spezia, Mia & Huang, Shifeng & Yuan, Chengfu & Zeng, Zongyue & Zhang, Linghuan & Ji, Xiaojuan & Liu, Wei & Huang, Bo & Luo, Wenping & Liu, Bo & Lei, Yan & Du, Scott & Vuppapapati, Akhila & Luu, Huong & Haydon, Rex & He, Tong-Chuan & Ren, Guosheng. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*. 5. 10.1016/j.gendis.2018.05.001.

Ulteriori biomarcatori possono essere valutati nella biopsia del tumore/campione chirurgico, ad esempio, Ki67 è una proteina rilevata solamente nelle cellule in fase di replicazione, ma non in quelle in normali condizioni di riposo. Quindi, la positività della cellula neoplastica a Ki67 in percentuale elevata di cellule indica che il tumore sta crescendo rapidamente ed è un fattore prognostico negativo. <sup>9</sup>

Il carcinoma alla mammella per un'ulteriore classificazione atta a comprendere meglio sia la prognosi ma, soprattutto la corretta scelta terapeutica comprende gruppi eterogenei di fenotipi classificati in base all'espressione dei marcatori biologici e *pathway* molecolari secondo linee guida AIOM 2021 che sono stati descritti precedentemente.

Ci sono 5 sottotipi principali: luminale A (ER), Luminale B/ HER2-, LUMINAL B/ HER2+, HER 2+ e triplo negativo. <sup>9, 10</sup>

Tabella 2 I sottotipi molecolari dei carcinomi alla mammella.

SOTTOTIPO	DEFINIZIONE SURROGATA	CARATTERISTICHE
<b>Simil-luminale A</b>	Simil-luminale A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ER-positivo</b></li> <li>• <b>HER2-negativo</b></li> <li>• Bassi livelli di <b>Ki67</b></li> <li>• Alti livelli di <b>PgR</b></li> <li>• Profilo molecolare di tipo "basso rischio" (se disponibile)</li> </ul>
<b>Simil-luminale B</b>	Simil-luminale B ( <b>HER2-negativo</b> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ER-positivo</b></li> <li>• <b>HER2-negativo</b></li> <li>• Alti livelli di <b>Ki67</b> o bassi livelli di <b>PgR</b></li> <li>• Profilo molecolare di tipo ad "alto rischio" (se disponibile)</li> </ul>
	Simil-luminale B ( <b>HER2-positivo</b> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ER-positivo</b></li> <li>• <b>HER2-positivo</b></li> <li>• Qualsiasi livello di <b>Ki67</b></li> <li>• Qualsiasi livello di <b>PgR</b></li> </ul>
<b>Sovraesprime HER2</b>	<b>HER2-positivo</b> (non luminale)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>HER2-positivo</b></li> <li>• Assenza di <b>ER</b> e <b>PgR</b></li> </ul>
<b>Basal-like</b>	Triplo-negativo (duttale)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>HER2-negativo</b></li> <li>• <b>ER</b> e <b>PgR-negativo</b></li> </ul>



## **1.6 Carcinoma Mammario in Stadio Precoce.**

È una condizione onco-patologica in cui le cellule cancerose hanno già iniziato a svilupparsi all'interno del tessuto mammario, hanno tutte le caratteristiche di cellule metastatiche maligne ma non si sono ancora diffuse negli altri distretti corporei circostanti e non. <sup>11</sup>

La definizione di cancro al seno in fase iniziale è allo stadio I o inferiore. In altre parole, il tumore al seno in fase iniziale è definito sulla base della mancanza di metastasi linfonodali e della dimensione clinica della lesione pari o inferiore a 2 cm. Nel quadro patologico del carcinoma mammario, è la migliore situazione prognostica possibile in quanto il paziente è privo di metastasi, segue trattamenti standardizzati mediante farmaci e si conclude con l'operazione chirurgica per la rimozione della massa tumorale, tantoché ad oggi il carcinoma duttale in situ è considerato una malattia non pericolosa per la vita del paziente pur essendo in un ambito tumorale maligno. <sup>12</sup>

Il rilevamento precoce del carcinoma mammario è fondamentale per aumentare le possibilità di guarigione e per avere la possibilità di adottare un approccio terapeutico meno aggressivo e pesante per il paziente. Una diagnosi precoce, un trattamento multidisciplinare e un *follow-up* regolare sono fondamentali per gestire efficacemente questa malattia complessa e migliorare i risultati clinici a lungo termine. <sup>13</sup>

Secondo i dati epidemiologici raccolti e gli studi clinici effettuati dalla Fondazione Umberto Veronesi in caso di tumori con stadiazione 0 o 1 che, quindi rientrano nella categoria del carcinoma mammario in fase precoce i tassi di sopravvivenza a 5 anni sono prossimi al 100%. <sup>11</sup>

### **1.6.a Opzioni terapeutiche.**

Il cancro alla mammella è una malattia complessa che richiede un approccio terapeutico multifattoriale per affrontarla in modo efficace. Esistono diversi approcci terapeutici disponibili, che vanno dalla chirurgia alla terapia farmacologica, alla radioterapia e all'immunoterapia. Le opzioni terapeutiche possono essere suddivise genericamente in terapie locali e sistemiche, ognuna delle quali svolge un ruolo fondamentale nel trattamento efficace della malattia. <sup>14</sup>

#### **Terapie Locali**

- **Chirurgia:** La chirurgia ad oggi rimane un pilastro fondamentale nel trattamento del cancro alla mammella soprattutto in casi di stadio precoce. Le opzioni chirurgiche includono mastectomia (rimozione completa della mammella) e chirurgia conservativa, in cui viene rimossa solo la massa tumorale. L'intervento chirurgico può essere seguito dalla ricostruzione mammaria.
- **Radioterapia:** La radioterapia viene utilizzata per rimuovere le cellule tumorali residue dopo l'intervento chirurgico, riducendo il rischio di recidiva locale. Può essere somministrata sia dopo la chirurgia conservativa che dopo la mastectomia. <sup>14</sup>

### Terapia sistemica:

È una terapia che ha come scopo quello di eradicare la malattia ed anche a migliorare il periodo libero da essa eliminando anche le possibili micro-metastasi. La terapia sistemica può essere sia preoperatoria (Neoadiuvante), post-operatoria (Adiuvante) o entrambe.

Appartengono a questa tipologia di terapia:

- **Chemioterapia:** La chemioterapia è una forma di terapia sistemica che coinvolge l'uso di farmaci antitumorali per distruggere le cellule cancerogene. Un tipo di chemioterapia, definita neoadiuvante, viene somministrata prima dell'intervento chirurgico per ridurre le dimensioni del tumore. Questo può permettere interventi chirurgici meno invasivi e migliorare le prospettive di guarigione. la chemioterapia neoadiuvante è sempre più utilizzata nel trattamento del cancro alla mammella, con l'obiettivo di ridurre la massa tumorale, controllare eventuali metastasi presenti e migliorare le prospettive di successo dell'operazione. Un aspetto fondamentale di questa strategia è la sua capacità di ridurre le dimensioni del tumore primario, rendendo l'operazione chirurgica più agevole, consentendo interventi meno invasivi e preservando al contempo la maggior quantità possibile di tessuto mammario sano.<sup>15, 16</sup> .

In alcuni casi, può addirittura permettere la conversione di tumori inoperabili in casi operabili. Inoltre, la chemioterapia neoadiuvante è efficace nel trattamento di eventuali metastasi a distanza, riducendo il rischio di diffusione del cancro ad altre parti del corpo. Questo è particolarmente importante nel cancro alla mammella, dato che questa forma tumorale ha una tendenza a diffondersi alle ghiandole linfatiche ascellari e ad altre parti del corpo, come ossa, fegato o polmoni. Un altro beneficio della chemioterapia neoadiuvante è che fornisce informazioni preziose sulla risposta della malattia al trattamento. Se il tumore risponde bene alla chemioterapia, è possibile predire un miglioramento delle prospettive di successo a lungo termine. Inoltre, se la terapia non risponde adeguatamente sulla massa neoplastica, ciò può indirizzare il medico verso alternative terapeutiche più appropriate. Come gli altri trattamenti chemioterapici anche la neoadiuvante può causare effetti collaterali significativi, come nausea, perdita di capelli, affaticamento e immunosoppressione. Questi effetti possono influenzare la qualità della vita del paziente e richiedere un

monitoraggio attento da parte del personale medico. Nella chemioterapia neoadiuvante per il cancro al seno, il regime standard è rappresentato dalla somministrazione di antracicline associate a dei farmaci chemioterapici come i Taxani ad esempio Paclitaxel. Diversi studi hanno dimostrato che i farmaci anti-HER2 possono aumentare il tasso di risposta completa alla terapia nei pazienti HER2-positivi. L'aggiunta di Carboplatino al regime standard è risultata efficace nei pazienti con cancro triplo negativo, in particolare con mutazione BRCA1/2.<sup>17</sup> La promozione della chemioterapia neoadiuvante per il cancro al seno coinvolge diversi enti e organizzazioni nel campo della ricerca medica e dell'oncologia. Tra questi, alcuni dei principali sono:

- **American Cancer society (ACS):** La ACS è impegnata nella ricerca, nell'educazione e nella promozione della prevenzione e del trattamento del cancro. La chemioterapia neoadiuvante è stata oggetto di studio e raccomandazione da parte di questa organizzazione.
- **National Cancer Institute (NCI):** Come parte degli National Institutes of Health (NIH) degli Stati Uniti, il NCI svolge un ruolo chiave nella ricerca e nello sviluppo di trattamenti per il cancro, inclusa la chemioterapia neoadiuvante
- **European Society For Medical Oncology (ESMO):** ESMO è una delle principali organizzazioni oncologiche in Europa. Svolge un ruolo fondamentale nella promozione delle migliori pratiche di trattamento, compresa la chemioterapia neoadiuvante, attraverso le sue linee guida cliniche e le conferenze scientifiche.
- **American Society of Clinical Oncology (ASCO):** ASCO è un'organizzazione professionale di oncologi che promuove l'eccellenza nella cura dei pazienti oncologici. Le sue linee guida cliniche forniscono raccomandazioni sull'uso della chemioterapia neoadiuvante e altri trattamenti.
- **Organizzazioni Sanitarie Nazionali:** In molti paesi, le organizzazioni sanitarie nazionali o gli istituti di ricerca oncologica promuovono l'uso della chemioterapia neoadiuvante come parte dei loro protocolli di trattamento standard per il cancro al seno.<sup>18</sup>

Questi sono solo alcuni esempi di enti e organizzazioni che hanno promosso l'uso della chemioterapia neoadiuvante per il cancro al seno negli ultimi anni. È importante notare che le raccomandazioni terapeutiche così come la somministrazione di alcuni farmaci possano variare tra paesi e istituzioni, ma a livello generale c'è sempre di più un consenso crescente sull'efficacia di questo approccio nel trattamento del cancro al seno in determinate situazioni.<sup>19</sup>

- **Terapia Ormonale:** Nei casi in cui il cancro alla mammella è positivo ai recettori ormonali PgR o ER, la terapia ormonale può essere prescritta per bloccare l'azione degli estrogeni o del progesterone sulle cellule tumorali. Questa è spesso utilizzato in combinazione con altri trattamenti, come la chirurgia e la radioterapia.
- **Terapia a Target:** La terapia biologica, anche conosciuta come terapia mirata, coinvolge l'uso di farmaci che mirano a specifici difetti nelle cellule tumorali. Ad esempio, il trastuzumab è un farmaco biologico utilizzato nel trattamento del cancro alla mammella che sovra esprime il recettore HER2.
- **Immunoterapia:** L'immunoterapia è un'opzione terapeutica in evoluzione che sfrutta il sistema immunitario del paziente per combattere il cancro. Può essere utilizzata da sola o in combinazione con altre terapie per migliorare la risposta antitumorale. La funzione fondamentale è quella di riarmare il sistema immunitario contro il tumore, per poi ottenere una risposta immunitaria in grado di eliminare la massa ed eventuali recidive successive.

L'approccio terapeutico al cancro alla mammella dipende da diversi fattori, tra cui lo stadio della malattia, la biologia tumorale e lo stato di salute generale del paziente. È essenziale che il trattamento sia personalizzato per ogni singolo individuo, tenendo conto delle sue esigenze e delle sue condizioni specifiche. L'integrazione di terapie locali e sistemiche, insieme a un approccio multidisciplinare che coinvolge specialisti in oncologia, chirurgia, radioterapia e altri campi correlati, è fondamentale per ottenere i migliori risultati nel trattamento del cancro alla mammella.<sup>14</sup>

## **1.7 Sistema immunitario, Linfociti T e Senescenza**

Il sistema immunitario è uno dei sistemi più complessi, sofisticati e fondamentali nell'organismo, ed ha il compito di proteggere l'intero organismo da agenti patogeni esterni, sostanze nocive e cellule tumorali.

Esso si compone di numerosi elementi cellulari e molecolari che assolvono a una specifica funzione all'interno del quadro immunitario.

Il sistema immunitario è diviso principalmente in due tipologie di immunità:

- **innata:** è il primo livello di difesa dell'organismo ed è presente fin dalla nascita. Esso si compone di meccanismi non specifici e rapidi che sono volti all'eliminazione dell'attacco patogeno. L'immunità innata comprende barriere fisiche come pelle e mucose, macrofagi e neutrofili che hanno una funzione fagocitaria e delle proteine antimicrobiche.
- **acquisita/adattativa:** è una tipologia di immunità che si sviluppa nel corso della vita in risposta al contatto con specifici antigeni e produce una risposta specifica e che perdura nel tempo. Il sistema immunitario di tipo adattativo comprende i linfociti B ovvero cellule immunitarie in grado di produrre anticorpi e linfociti T (citotossici, *helper* e *natural killer*) con azione di coordinamento della risposta immunitaria e distruzione delle cellule colpite da infezioni o patologie. Lo scopo del sistema adattativo è quello di creare una memoria immunologica al fine di garantire una risposta rapida ed efficace qualora si verificasse nuovamente una infezione mediata da uno specifico antigene. L'immunità acquisita può essere divisa in immunità umorale e immunità cellulo-mediata. La prima è caratterizzata dalla produzione all'interno di fluidi corporei mentre la seconda sfrutta l'attività dei linfociti T.

I diversi sottotipi di immunità lavorano insieme per proteggere l'organismo da agenti patogeni. Per svolgere a pieno e correttamente le sue funzioni, il sistema immunitario è composto da una serie di elementi come organi, cellule o molecole segnale.

Nel sistema immunitario troviamo:

- Organi Linfoidi: midollo osseo, linfonodi, timo, milza e tessuto linfoide associato alle mucose (MALT)
- Molecole immunologiche: immunoglobuline (anticorpi), citochine, proteine del complemento, recettori del sistema immunitario.

- Barriere Fisiche e Chimiche: pelle, mucose, microbiota e microbioma.
- Componenti cellulari del sistema immunitario: linfociti B e T, cellule dendritiche, Natural Killer, cellule fagocitiche come macrofagi e neutrofili, cellule del sistema reticolare-endoteliale che si trovano nella milza, nel fegato e nei linfonodi. <sup>20</sup>

### **1.7.a Linfociti T**

I linfociti T sono una componente essenziale del sistema immunitario, ricoprono un ruolo fondamentale nella difesa dell'organismo sia contro le infezioni sia contro la presenza di cellule anomale. Questa tipologia di globuli bianchi, sono originati dal midollo osseo, maturano nel timo e successivamente si immettono nella circolazione ematica e nei tessuti linfatici in cerca di presenze anormali all'interno dell'organismo.

I linfociti T possono essere suddivisi in diverse sottocategorie, ognuna delle quali ha delle peculiarità ed una funzione specifica nell'immunità adattativa<sup>20</sup>:

- **I linfociti T helper (Th)**, responsabili di innescare e regolare il processo immunitario. Si suddividono ulteriormente in diverse sottocategorie:
  - Th1: Stimolano la risposta immunitaria cellulare, attivando i macrofagi e promuovendo la produzione di anticorpi IgG
  - Th2: Favoriscono la risposta immunitaria umorale, stimolando la produzione di anticorpi IgE e IgA. [21]
  - Th17: Sono coinvolti nella risposta di difesa contro batteri e funghi.
- **Linfociti T citotossici (CTL)**: Sono specializzati nell'individuare ed eliminare le cellule infette da agenti patogeni, così come quelle tumorali che riconoscono come anomale. Sono in grado di indurre nelle cellule bersaglio apoptosi mediante la produzione di enzimi e sostanze chimiche. <sup>20</sup>
- **Linfociti T memoria**: Dopo il contatto con l'antigene, una percentuale dei linfociti T si differenzia in linfociti T memoria, fornendo memoria immunologica che consente una risposta più rapida ed efficace in caso di reinfezione da parte dello stesso antigene. <sup>20</sup>
- **Linfociti T helper follicolari**: sono responsabili della formazione e della regolazione dei follicoli linfatici nei linfonodi. Essi ricoprono un ruolo cruciale nella risposta immunitaria contro antigeni particolarmente complessi e difficili da eliminare, ad esempio quelli somministrati durante la vaccinazione. <sup>20</sup>

- **I linfociti T regolatori (Treg):** sono una sottopopolazione di cellule del sistema immunitario coinvolte nella regolazione negativa della risposta immunitaria. Il loro ruolo principale è quello di sopprimere la risposta immunitaria e mantenere l'omeostasi immunologica prevenendo l'autoimmunità eccessiva e l'infiammazione incontrollata. Le cellule Treg esprimono il recettore per il fattore di crescita dei linfociti T (IL-2) e una proteina di superficie chiamata CD25, oltre a un fattore di trascrizione specifico chiamato FoxP3, che è considerato il marcatore principale delle cellule Treg. Il loro ruolo è cruciale nel mantenere un equilibrio nel sistema immunitario, in quanto possono sopprimere le risposte immunitarie eccessivamente attive che potrebbero danneggiare i tessuti sani. Questo li rende importanti anche nel prevenire le malattie autoimmuni. Sebbene abbiamo una funzione di protezione per l'organismo, un'eccessiva attività dei linfociti Treg potrebbe anche risultare dannosa, contestualizzata nell'ambito tumorale soprattutto, con un'iper-attivazione attribuibile alle cellule MSDC, contribuendo così alla progressione della malattia. <sup>20</sup>

I linfociti T svolgono una vasta gamma di funzioni nell'immunità adattativa: <sup>20</sup>

- A. Riconoscimento degli antigeni:** possono riconoscere gli antigeni presentati dalle cellule presentanti l'antigene (APC), come i macrofagi e le cellule dendritiche, tramite il loro recettore per l'antigene (TCR).
- B. Attivazione di altri linfociti I linfociti T:** in particolare i T-helper, hanno una funzione di attivatori nei confronti degli altri leucociti come i macrofagi, i linfociti B e i neutrofili, coordinando tutti gli elementi della risposta immunitaria. <sup>20</sup>
- C. Regolazione negativa dell'infiammazione:** i Treg, sono coinvolti nella regolazione negativa dell'infiammazione, che è utile nel caso il processo infiammatorio sia eccessivo o non coordinato anche dopo il ripristino dell'equilibrio omeostatico. <sup>20</sup>
- D. Eliminazione di cellule infette tumorali:** i linfociti T, in particolare i citotossici (CD8+) sono atti all'eliminazione di cellule infette e tumorali tramite il riconoscimento del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I). Queste molecole vengono espresse a livello della superficie membranale di cellule tumorali che, una volta riconosciute dai linfociti T, vengono eliminate tramite il rilascio da parte delle cellule immunitarie di granzimi e perforine che inducono la cellula target all'apoptosi. <sup>20</sup>



- E. **Memoria immunologica:** tramite l'attività dei linfociti T memoria, il sistema immunitario è in grado di creare una memoria immunologica in seguito all'esposizione ad un antigene affinché, in caso di successiva esposizione, sia garantita una risposta immunitaria più rapida ed efficace. Le cellule della memoria immunitaria si dividono in due gruppi ovvero cellule T della memoria centrale che risiedono nel tessuto linfoide e negli organi ad esso annessi e le cellule T di memoria effettoria allocate a livello dei tessuti periferici. <sup>21, 22</sup>

### **1.7.b Cellule Senescenti**

Si definisce senescente una cellula che subisce un cambiamento fenotipico ed un arresto irreversibile del ciclo cellulare. Le cellule senescenti si accumulano nell'organismo nel corso del tempo e sono coinvolte in diversi processi biologici, uno su tutti è l'invecchiamento. <sup>23</sup>

Le cellule senescenti si distinguono dalle cellule con ciclo cellulare regolare in base a diversi fattori: <sup>24</sup>

- A. **Arresto del ciclo cellulare:** Le cellule senescenti smettono di proliferare e si arrestano in modo permanente nel loro ciclo cellulare, non hanno possibilità di retro-attivazione, rimangono sempre nella condizione di senescenza, nonostante rimangono metabolicamente attive e siano in grado di produrre e secernere diverse molecole.
- B. **Secrezione di fattori infiammatori:** Le cellule senescenti secernono differenti molecole pro-infiammatorie, un fenomeno noto come "sindrome da secrezione di senescenza" (SASP). Questa secrezione può promuovere l'infiammazione cronica nell'ambiente circostante, contribuendo allo sviluppo di malattie legate all'invecchiamento e alla patogenesi tumorale.
- C. **Alterazioni nel DNA:** Le cellule senescenti spesso presentano danni al DNA e/o telomeri accorciati, il che può compromettere la stabilità genomica e contribuire all'accumulo di mutazioni genetiche.
- D. **Aumento dell'attività delle proteine di stress:** Le cellule senescenti attivano vie di segnalazione dello stress cellulare, come il pathway delle chinasi attivate da miogeni (MAPK) e il pathway del fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1), in risposta a danni cellulari o stress ambientali.

L'acquisizione di un fenotipo senescente è determinata da diversi fattori:

- **Danneggiamento del DNA:** Lesioni al DNA causate da radiazioni ionizzanti, agenti chimici o processi metabolici possono indurre il cambiamento cellulare al fenotipo senescente.
- **Stress ossidativo:** L'accumulo di radicali liberi e altre specie reattive dell'ossigeno dovuti a processi biochimici dell'organismo, può danneggiare le biomolecole cellulari e innescare la senescenza cellulare.
- **Infiammazione cronica:** L'infiammazione cronica associata all'invecchiamento può favorire la formazione di cellule senescenti attraverso l'attivazione di vie di segnalazione infiammatorie che inducono le cellule alla senescenza.
- **Telomeri accorciati:** Il progressivo accorciamento dei telomeri durante le divisioni cellulari porta alla perdita della capacità riproduttiva cellulare e alla loro senescenza. È un meccanismo principalmente difensivo cellulare, affinché la cellula abbia un tempo biologico limitato e non eccessivo per non incorrere in danni che potrebbero portarla ad un fenotipo tumorale.<sup>23, 24</sup>

Le cellule senescenti hanno una rilevanza significativa nell'ambito dell'invecchiamento e dello sviluppo di patologie. Sono infatti implicate:<sup>23</sup>

1. nella patogenesi delle **malattie croniche:** l'accumulo può influenzare lo sviluppo di patologie oncologiche, cardiovascolari, neurodegenerative e diabete.
2. **nel declino della funzione tissutale:** secernendo molecole con attività infiammatoria possono contribuire al deterioramento delle funzioni ed interferire con la rigenerazione cellulare, inducendo invecchiamento e morte.
3. nella patogenesi del **cancro:** Sebbene la senescenza cellulare possa inizialmente fungere da meccanismo di soppressione tumorale, le cellule senescenti persistenti possono favorire lo sviluppo e la progressione del cancro attraverso la promozione dell'infiammazione cronica e dell'angiogenesi tumorale mediante il rilascio delle SASPs.

La presenza di cellule senescenti e il loro impatto nel tessuto biologico di interesse sottolineano l'importanza di un approfondimento della ricerca di strategie per mitigare

il loro effetto negativo sulla salute umana senza, tuttavia, eliminarle completamente in contesti in cui rappresentano i prodotti dell'orologio biologico di un organismo sano. Comprendere le caratteristiche della senescenza, gli eventi che la causano e le implicazioni delle cellule senescenti all'interno dei differenti contesti clinici può aprire la strada a strategie terapeutiche e preventive per promuovere un invecchiamento sano e contrastare le malattie legate all'età e ridurre il rischio di innescare delle mutazioni che causano patologie oncologiche.<sup>23</sup> Nel momento in cui una cellula acquisisce un fenotipo senescente, pur essendo teoricamente in una condizione di quiete come detto precedentemente, libera diverse molecole, tra cui citochine, fattori di crescita e proteine segnale. Questo insieme di proteine infiammatorie, note come *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP) ad esempio, ha il potere di modellare il microambiente circostante e influenzare il destino delle cellule vicine e dei tessuti adiacenti.<sup>23</sup>

L'insieme delle proteine segnalatrici prodotte dalle cellule senescenti, le SASP, possono modificare il comportamento delle cellule contigue in base al contesto (inducendo proliferazione o senescenza) e richiamando le cellule del sistema immunitario (in generale i macrofagi per procedere con la loro rimozione). Le SASP sono segnali chimici come:

1. Citochine pro-infiammatorie come IL-6, IL-8, TNF-ALFA, IL-1.
2. Fattori di crescita come TGF-Beta, FGF e VEGF.
3. Proteine pro-infiammatorie.
4. Enzimi proteolitici come metalloproteasi che contribuiscono della matrice extracellulare.
5. Fattori chemiotattici come MCP-1<sup>25</sup>

Tuttavia molto spesso le cellule tumorali sfruttano la condizione di senescenza per promuovere la crescita tumorale, infatti:

- Secernono fattori di crescita per angiogenesi, per la crescita e replicazione cellulare e fattori per la degradazione della matrice che contribuiscono alla crescita della massa tumorale.
- Attivano vie di segnalazione per crescita e sopravvivenza delle cellule ed inibizione delle vie dell'apoptosi.

- Causano danni al DNA delle cellule sane tramite l'eccessiva produzione di radicali liberi ed altre molecole reattive implicate in un processo infiammatorio che perdura nel tempo (infiammazione cronica) <sup>25, 26</sup>

### **1.7.c Linfociti T senescenti**

Come tutte le cellule, anche le cellule del sistema immunitario possono andare incontro a senescenza, definita come immunosenescenza. Considerata uno dei meccanismi alla base del legame tra invecchiamento e patologie che coinvolgono il sistema immunitario (come le malattie autoimmuni e i tumori), l'immunosenescenza compromette la capacità di rispondere a nuove minacce, aumentando così la suscettibilità alle infezioni. Inoltre è associata a un incremento della produzione di autoanticorpi – da cui deriva la tendenza a sviluppare patologie autoimmuni [27-28].

Con l'avanzare dell'età il numero totale di linfociti T può diminuire significativamente. Tuttavia, anche in assenza di variazioni significative dei loro livelli, il rischio di contrarre infezioni o di sviluppare malattie tipicamente associate all'invecchiamento (come i tumori) aumenta a causa della riduzione dello spazio disponibile per nuove cellule immunitarie. Infatti i linfociti T senescenti, più resistenti alla morte cellulare, tendono ad accumularsi, mentre la produzione di nuovi linfociti T e la loro capacità di differenziarsi in cellule mature diminuisce. Tuttavia, l'accumulo di linfociti T senescenti non è associato solamente all'età, ma anche a condizioni patologiche come la progressione tumorale. <sup>25</sup>

I linfociti T senescenti, come tutte le cellule senescenti, sono caratterizzate dalla sovra espressione di marcatori di senescenza, CD28+, CD57 e KLRG1+ , dall'arresto permanente del ciclo cellulare e dalla secrezione di una gamma di fattori infiammatori e citochine (SASPs). <sup>26, 23</sup>

In particolare, la produzione di citochine pro-infiammatorie favoriscono l'infiammazione cronica e la secrezione di citochine immunosoppressive, come il fattore di crescita trasformante beta (TGF- $\beta$ ) e l'interleuchina-10 (IL-10), può inibire l'attività delle cellule T attivate e promuovere la differenziazione delle cellule T regolatorie (Treg), creando così un ambiente immunosoppressivo favorevole alla crescita tumorale (Fig.7).

Inoltre, i linfociti T senescenti sono caratterizzati dalla positività ai *markers* di superficie CD3, CD4, CD8, CD57 e KLRG-1 e la negatività a CD28.

Tuttavia, i linfociti T senescenti possono anche avere un ruolo antitumorale, chiaramente in misura minore rispetto ai linfociti T attivati, in quanto producono perforine e granzimi, interferone-gamma (IFN- $\gamma$ ).

Questo suggerisce che l'individuazione dei linfociti T senescenti come target potrebbe rappresentare una strategia terapeutica promettente per migliorare l'efficacia degli approcci immunoterapici nel trattamento del cancro. <sup>26</sup>

#### **1.7.d Cellule Esauste**

Le cellule esauste hanno perso la capacità di proliferare, ma rimangono metabolicamente attive. Tale condizione è dovuta da danneggiamento del DNA, causato da differenti fattori come ad esempio lo stress ossidativo, l'infiammazione cronica, o danni accumulati nel corso del tempo. I danni accumulati possono attivare il cosiddetto "programma di risposta allo stress", che impedisce alla cellula di proliferare ulteriormente, ma le consente comunque di rimanere metabolicamente attiva in minima parte, ma a differenza delle senescenti in modalità reversibile. <sup>27</sup>

L'accumulo di cellule esauste è spesso associato a delle condizioni fisiopatologiche legate all'invecchiamento del corpo come malattie croniche e degenerative, malattie cardiovascolari e cancro ma esse svolgono anche un ruolo fondamentale in condizioni fisiologiche per il mantenimento dell'integrità tissutale, omeostasi e turn over corretto degli elementi cellulari all'interno dell'organismo. <sup>28</sup>

#### **1.7.e Linfociti T esausti**

I linfociti T esausti sono delle cellule immunitarie che hanno perso la loro capacità funzionale ed effettiva in modo reversibile a causa di stimoli persistenti nel tempo dovuti alla presenza dell'antigene tumorale. Questa sottopopolazione è caratterizzata da un fenotipo specifico, come l'espressione di marcatori di esaurimento sulla loro superficie come PD-1, TIGIT e LAG-3 ma hanno anche una ridotta capacità proliferativa ed una diminuzione dell'attività citotossica nei confronti delle cellule tumorali oltre ad una limitata produzione di interleuchina 2 (IL-2), interferone-gamma (IFN- $\gamma$ ) e *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ). <sup>27, 28</sup>

- PD-1 (*Programmed Death-1*): un recettore inibitorio che, una volta legato al ligando PD-L1 che è in grado di ridurre l'attività delle cellule T e la capacità di rilasciare citochine citotossiche.

- TIGIT (*T-cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains*): un recettore con funzione inibitoria nei confronti delle cellule T.
- LAG-3 (*Lymphocyte Activation Gene 3*): limita anch'esso l'attività delle cellule T.

Le cellule esauste sono di interesse clinico soprattutto nell'ambito dell'immunoterapia per la somministrazione di farmaci che sopprimono i *check-point* immunitari come PD-1 (ad esempio il Pembrolizumab) e TIGIT, la somministrazione di essi, può sia eliminare il meccanismo di difesa delle cellule tumorali ma anche ripristinare la funzionalità di T esausti contro il la malattia oncologica.<sup>29, 30</sup>

## **1.8 MDSC**

Le cellule soppressorie di origine mieloide (MDSC) sono un componente fondamentale del complesso microambiente tumorale e svolgono un ruolo cruciale per l'immunosoppressione e la promozione della progressione tumorale.

La mielopoiesi, ovvero il processo di produzione delle cellule ematopoietiche a partire dal midollo osseo, è un evento complesso e cruciale per il mantenimento dell'omeostasi dell'organismo, dove le cellule staminali ematopoietiche creano le diverse componenti presenti nel sangue.<sup>31</sup>

Il processo può essere suddiviso in diverse fasi, ciascuna con un ruolo ed una funzionalità precisa per produrre delle linee cellulari ematopoietiche in modo corretto.

Le differenti fasi sono 3: proliferazione, differenziazione e maturazione ed assicurano la produzione continua di globuli rossi per il trasporto dell'ossigeno, globuli bianchi per la difesa immunitaria e piastrine per la coagulazione del sangue.

Tuttavia, in condizioni patologiche, il processo di differenziazione delle cellule mieloidi può essere compromesso. Le cellule mieloidi immature o parzialmente differenziate possono essere reclutate nei tessuti, dove acquisiscono proprietà immunosoppressive e contribuiscono alla creazione di un microambiente favorevole alla progressione della malattia.<sup>31, 32</sup>

Questo processo errato di mielopoiesi può essere influenzato da diverse cause, tra cui la presenza di citochine, fattori di crescita, segnali tumorali e condizioni infiammatorie croniche.<sup>32</sup>

Le cellule tumorali nel microambiente tumorale possono secernere fattori che promuovono l'espansione e l'attivazione delle MDSC, che inibendo il sistema immunitario promuove la progressione tumorale.

Le MDSC possono essere suddivise in due principali sottopopolazioni: Monociti-mieloidi (M-MDSC) e Poli Morfo Nucleati-mieloidi (PMN-MDSC), che differiscono per funzione e marcatori.

Le M-MDSC sono definite come CD33+CD14+HLA-DR<sup>-/lo</sup>CD15-:

1. CD14: È un marker comune per i monociti e i macrofagi. Essa è una glicoproteina di superficie e agisce da co-recettore con TLR4 per rilevare patogeni e, nel contesto delle MDSC, contribuiscono a creare un ambiente immunosoppressivo.



2. CD33: Essa è un recettore di superficie appartenente alla famiglia delle *sialic acid-binding proteins* (Siglec) ed è un antigene associato ai monociti e alle cellule mieloidi oltre ad essere in grado di inibire l'attivazione delle cellule T.
3. HLA-DR: è una molecola del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II). Le M-MDSC tendono ad avere una bassa espressione di HLA-DR, che è coinvolto nella presentazione dell'antigene alle cellule T contribuendo all'attività immunosoppressori.

Le PMN-MDSC sono definite come CD33+CD14-CD15+ o CD33+CD14-CD66b+:

1. CD15: È un marker e recettore di membrana comune per i neutrofili e le cellule mieloidi immature. Le PMN-MDSC spesso esprimono CD15 che è coinvolto nei processi di adesione e migrazione cellulare.
2. CD66b: È un altro marker appartenente alla famiglia delle CEACAM (*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules*) che è spesso presente sui neutrofili e può essere espresso sulle PMN-MDSC. Esso è coinvolto nell'adesione cellulare, degranolazione e nell'attivazione dei neutrofili.

Il principale meccanismo attraverso cui le MDSC influenzano la risposta immunitaria è la soppressione delle cellule T. Le MDSC esercitano la loro attività immunosoppressiva sui linfociti T attraverso diversi funzionamenti, tra cui: <sup>32, 33</sup>

- **Produzione di ossido nitrico (NO) e l'enzima indoleamina 2,3 deidrogranasi (IDO):** l'ossido nitrico può inibire l'attivazione dei linfociti T mediante la reazione di nitrosilazione, mentre IDO è deputato alla degradazione del triptofano che è un amminoacido essenziale per l'attivazione delle cellule T.
- **Produzione di elevati livelli di fattori o ligandi per le chemochine:** come CCL2 e CCL22 che richiamano le cellule dell'immunità verso il microambiente tumorale, creando quindi un contesto sfavorevole poiché le componenti immunitarie verranno disattivate successivamente dalle MDSC.
- **Presentazione dell'antigene:** le MDSC possono anche sopprimere la risposta immunitaria mediante l'esposizione dell'antigene riducendo quindi l'attività dei linfociti T. Questo meccanismo può avvenire attraverso la down-regolazione di molecole co-stimolatori sulle cellule presentanti l'antigene come CD80 oppure

mediante l'espressione dei *checkpoint* immunitari che bloccano l'attività delle cellule immunitarie.

- **Promozione e differenziazione dei Treg:** i linfociti Treg sono una popolazione di cellule T con una funzione particolare ovvero hanno funzione immunosoppressiva, si occupano di spegnere la risposta immunitaria. Le MDSC attivano le cellule Treg mediante l'interleuchina 10 (IL-10) e TGF-  $\beta$
- **Inibizione delle cellule *natural killer* (NK):** le MDSC, tramite la produzione di fattori immunosoppressivi quali arginasi-1 (ARG-1), specie reattive dell'ossigeno (ROS) e ossido nitrico (NO), sono in grado di inibire l'attività delle cellule NK favorendo l'instaurarsi di un ambiente immunosoppressivo che contribuisce alla sopravvivenza delle cellule tumorali.

Le MDSC sono state correlate con la resistenza alla terapia antitumorale, inclusa la chemioterapia, l'immunoterapia e la terapia mirata. La correlazione tra la presenza massiccia di queste cellule nella sede tumorale associata ad una minor risposta del paziente alla terapia è ad oggi un importante tema di studio, in quanto queste cellule non solo danneggiano la cura ma creando immunosoppressione velocizzano in modo esponenziale l'espansione clonale tumorale.<sup>34</sup> Di conseguenza, il *targeting* delle MDSC è un'opportunità terapeutica e scientifica fondamentale per migliorare l'efficacia della terapia antitumorale, contrastare la resistenza e avere un quadro prognostico più preciso. Diverse strategie sono state proposte per *targeting* delle MDSC, tra cui l'uso di agenti chemioterapici, inibitori delle citochine immunosoppressive e modulatori delle vie di segnalazione coinvolte nella differenziazione e funzione delle MDSC.<sup>32</sup>

Inoltre, l'impiego di terapie combinate mirate a inibire le MDSC e a potenziare la risposta immunitaria antitumorale, potrebbe rappresentare un approccio promettente per migliorare l'efficacia della terapia antitumorale e prevenire la progressione del tumore.<sup>34</sup>

## **1.9 Correlazione tra cellule T senescenti e cellule soppressorie di derivazione mieloidi (MDSC) nel contesto del microambiente tumorale (TME)**

Le cellule tumorali maligne hanno capacità di eludere il sistema immunitario attraverso vari meccanismi complessi, tra cui l'interazione con cellule del microambiente tumorale. Due popolazioni cellulari di particolare interesse in questo contesto sono le cellule soppressive derivate da mieloidi (MDSC, Myeloid-Derived Suppressor Cells) e le cellule T senescenti.

Esiste una relazione sinergica tra MDSC e cellule T senescenti nel microambiente tumorale nel paziente oncologico al seno. Come anticipato nel capitolo 1.8, le cellule MDSC, tramite i loro meccanismi soppressivi descritti nei precedenti capitoli, possono indurre la senescenza nelle cellule T, aumentando così la popolazione di cellule T senescenti all'interno del tumore. A loro volta, le cellule T senescenti, attraverso il rilascio del SASP, possono reclutare e attivare ulteriormente le MDSC, creando un ciclo di feedback positivo che rinforza l'immunosoppressione e favorisce la progressione del tumorale

L'interazione tra cellule MDSC e cellule T senescenti rappresenta un meccanismo cruciale attraverso cui il tumore può evadere la sorveglianza immunitaria. Comprendere meglio questa interazione nel microambiente potrebbe aprire nuove strade per lo sviluppo di terapie antitumorali mirate, volte a interrompere questo ciclo patologico e a ripristinare l'efficacia delle risposte immunitarie antitumorali.

## 2. Scopo dell'elaborato

Il carcinoma al seno non metastatico è una forma di cancro al seno in cui le cellule tumorali non si sono diffuse ad altre parti del corpo. La terapia neoadiuvante è solitamente utilizzata in questi casi per ridurre la dimensione del tumore prima dell'intervento chirurgico.

Nonostante i significativi progressi nella comprensione e nel trattamento del carcinoma al seno, molti pazienti non rispondono alla terapia e per questo è fondamentale cercare nuovi biomarcatori per migliorare non solo la cura ma anche il monitoraggio della terapia. In molti studi è stato dimostrato che le cellule T senescenti e le MDSC sono coinvolte nella progressione tumorale.

Ad oggi significativi risultati sono emersi dallo studio dell'interazione tra le cellule tumorali e quelle del sistema immunitario nel Microambiente tumorale.

L'esperienza di tirocinio è stata svolta presso il laboratorio di Onco-Immunologia del Centro di Ricerca Traslazione di Malattie Autoimmuni ed Allergiche dell'Università del Piemonte Orientale. (CAAD-UPO).

È stato effettuato sotto la direzione della Professoressa Alessandra Gennari e Dottoressa Veronica Martini.

I dati trattati sono frutto di attività sperimentali e di analisi condotte in loco.

Quello che abbiamo voluto indagare in questa tesi è se i linfociti T senescenti, esausti e le MDSC circolanti avessero un impatto sulla prognosi dei pazienti con tumore al seno non metastatico.

Per cui a tale scopo abbiamo:

- valutato la percentuale delle sottopopolazioni di cellule MDSCs (di derivazione Monocitaria (M-MDSCs) e granulocitaria (PMN-MDSCs), mediante citofluorimetria;
- caratterizzato, mediante citofluorimetria, le popolazioni di cellule T senescenti e esauste utilizzando marcatori specifici (CD57 e KLRG1 per le senescenti, LAG3, PD1 e TIGIT per le esauste);
- indagato la relazione tra MDSC e linfociti T senescenti ed esausti con la sopravvivenza e risposta alla terapia.

## **3. Materiali e Metodi**

### **3.1 Reclutamento dei pazienti**

In questa tesi sono stati analizzati 58 soggetti con tumore alla mammella in trattamento neoadiuvante, di età compresa tra i 34 e 83 anni, afferenti alla S.C.D.U. di Oncologia del Dipartimento di Medicina Traslazionale (DIMET) dell'Azienda Ospedaliero Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara. Le caratteristiche dei pazienti sono riportate in tabella 7 nel capitolo "Risultati".

Si tratta di uno studio osservazionale, prospettico e traslazionale di coorte. I criteri di inclusione ed esclusione per l'arruolamento dei pazienti nello studio sono elencati in tabella 3.

Tabella 3 Tabella riassuntiva dei criteri di inclusione ed esclusione dello studio.

<b>Pazienti di età <math>\geq</math> 18 anni</b>	Pazienti di età < 18 anni
<b>Paziente con diagnosi di tumore alla mammella</b>	Pazienti con controindicazioni al ricevimento della terapia
<b>Pazienti candidativi alla esecuzione della terapia neoadiuvante</b>	Ritiro del consenso informato
<b>Pazienti in grado di firmare il consenso informato</b>	

In occasione di una prima visita o di una visita di controllo periodica, i soggetti che ad una prima valutazione rispondono ai criteri di inclusione ed esclusione (tabella 3), sono stati invitati a prendere parte allo studio e, dopo idonea informazione, è stato chiesto di firmare il consenso informato e il documento per la privacy dei dati dello studio (INFORMATIVA E MANIFESTAZIONE DI CONSENSO AL TRATTAMENTO DEI DATI PERSONALI - ai sensi degli artt. 13 e 14 del Reg. UE 20/679).

Il CI definisce in modo chiaro e comprensibile gli obiettivi dello studio, i diritti e le responsabilità, i benefici e i rischi, le modalità di prelievo e di trattamento dei campioni, la garanzia dell'anonimato per tutta la durata dello studio, il trattamento dei dati al solo scopo scientifico, nonché la modalità di gestione dei dati e la possibilità di revocare il consenso in qualsiasi momento.

Solo dopo che il paziente ha firmato il CI e modulo di privacy, viene anonimizzato assegnando un codice univoco di identificazione, programmato il prelievo secondo schema definito nel protocollo di studio e compilato un database (elettronico Case Report Form – eCRF) con le informazioni cliniche coerenti con lo scopo dello studio. Ai soggetti che hanno aderito allo studio, è stato prelevato un campione di sangue in concomitanza ad un prelievo di sangue venoso ad uso clinico e i loro dati verranno inseriti nella eCRF.

### **3.2 Procedura di raccolta e trasporto dei campioni biologici**

Per ogni paziente incluso nello studio, è prevista la raccolta di 20mL di sangue periferico in provette con anticoagulante a due time points: prima dell'inizio della terapia (T0, baseline) e a alla fine della terapia (T1, End of Treatment – EoT) Figura 7).

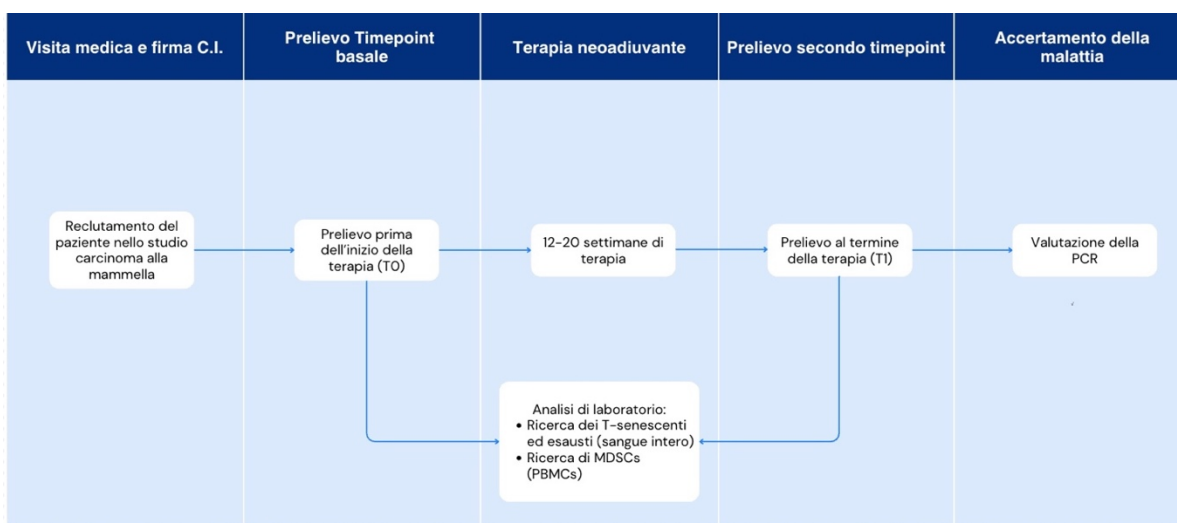


Figura 7 Workflow del progetto SenNeoAd

Ciascuna provetta di sangue periferico viene etichettata segnando il codice univoco assegnato al soggetto, la data di nascita e quella del giorno del prelievo e il timepoint a cui è stato fatto il prelievo. I campioni vengono poi inviati al laboratorio di Oncolmmunologia del Centro di Ricerca Traslazionale di Malattie Autoimmuni e Allergiche dell'Università del Piemonte Orientale (CAAD – UPO) e processati per le analisi entro le 24 ore dal momento del prelievo.

Dato che per tutti i campioni è prevista l'analisi citofluorimetrica sia direttamente su sangue periferico che su Periferal Blood Mononuclear Cells (PBMC), sono state scelte come provette di raccolta del campione quelle che presentano l'acido etilendiamminotetracetico (EDTA) come anticoagulante presente all'interno delle provette, ovvero un composto chimico che agisce come chelante del calcio.



Lo ione calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) è un fattore fondamentale per la coagulazione dei campioni ematici in quanto svolge un'azione di legame tra i fattori della coagulazione e i fosfolipidi della membrana plasmatica delle cellule. L'EDTA è in grado di sequestrare tale ione, bloccando in modo irreversibile la coagulazione ematica.

Le provette sono processate nel laboratorio di Immuno-Oncologia al centro di Oncoimmunologia del Centro di Ricerca Traslazionale di Malattie Autoimmuni e Allergiche dell'Università del Piemonte Orientale CAAD-UPO a massimo 4 ore dal prelievo.

L'uso di un ambiente di lavoro sterile ed il rispetto delle norme di laboratorio da parte dell'operatore garantiscono la minimizzazione dei potenziali rischi di contaminazioni del campione durante la manipolazione e la sicurezza del personale coinvolto.

### **3.3 Citofluorimetria**

La citometria a flusso, o citofluorimetria, rappresenta una tecnica multiparametrica di laboratorio capace di analizzare, quantificare e separare cellule o microparticelle in una sospensione liquida.

Il campione di cellule, precedentemente arricchito con anticorpi coniugati a fluorocromi, viene inserito all'interno di una camera di flusso che permette la visualizzazione delle cellule in analisi in modo selettivo e organizzato. Le cellule, inoltre, subiscono un processo di allineamento che ne consente la corretta visualizzazione. Il segnale generato durante l'analisi viene acquisito e trasformato in un grafico mediante l'impiego di *software* specifici.

Questa tecnica a flusso dispone di uno strumento denominato citofluorimetro caratterizzato dalla presenza di laser (i più complessi hanno più di sette fasci di luce) che favoriscono una analisi rapida e automatica delle popolazioni in sospensione, misurandone contemporaneamente le caratteristiche fisiche e/o biochimiche quali volume, complessità e fluorescenza appartenenti alla stessa popolazione cellulare.

Questo strumento permette l'analisi di marcatori di differenziamento cellulare, di superficie, intracitoplasmatici e intranucleari oppure la valutazione del contenuto cellulare di DNA. Attraverso la citometria a flusso è anche possibile fare analisi del ciclo cellulare, discriminare tra cellule vive, apoptotiche o necrotiche. Per le analisi vengono adoperati tanti fluorocromi differenti che emettono a diverse lunghezze d'onda.<sup>35</sup>

La potenzialità di questa tecnica è la capacità di avere sia:

- (I) la frequenza di una determinata popolazione, espressa in percentuale o come numero di eventi (singole cellule identificate dal citofluorimetro)
- (II) i livelli di espressione di un determinato marcatore, mediante un valore arbitrario di Intensità Media di Fluorescenza (Mean Fluorescence Intensity – MFI).

Il MFI è calcolato come la media dell'intensità di fluorescenza per tutte le cellule che passano attraverso il laser nel citofluorimetro. Ogni cellula viene eccitata dalla luce laser e l'emissione di fluorescenza viene rilevata e misurata. La fluorescenza può derivare da anticorpi coniugati a fluorocromi, coloranti vitali o proteine fluorescenti.

Il MFI può quindi indicare il livello di espressione di un particolare antigene su una popolazione di cellule che può essere:

- *HIGH*: un MFI alto indica un'elevata espressione dell'antigene. Questo può riflettere un'attivazione cellulare, una risposta allo stimolo o un'abbondanza naturale dell'antigene.
- *MODERATE*: un MFI moderato suggerisce un livello intermedio di espressione antigenica. Questo è spesso considerato il livello base per le cellule ed è la condizione standard o fisiologica dell'espressione dell'antigene.
- *LOW*: un MFI basso indica una scarsa espressione dell'antigene sulla superficie cellulare o all'interno della cellula. Questo potrebbe rappresentare che solo una piccola percentuale delle molecole di interesse è presente nelle cellule analizzate. In alcuni casi è normale per le cellule mentre in altri induca una regolazione negativa dell'antigene.

L'immunofluorescenza a vetrino permette l'esame di poche cellule, nel citofluorimetro si analizzano più cellule contemporaneamente oltre all'espressione stessa delle proteine. Attua, dunque, una analisi in maniera standardizzata da un punto di vista funzionale e biochimico dei marcatori presenti nelle cellule. Questo strumento, inoltre, permette di analizzare in modo veloce e standardizzato le popolazioni cellulari dal punto di vista fenotipico, attraverso l'individuazione di antigeni o marcatori sulla membrana.

Ogni citofluorimetro ha un *software* che consente, una volta acquisito il campione, di effettuare un'analisi della popolazione per vedere i marcatori sulla membrana delle cellule.

Il citofluorimetro si avvale di tre componenti fondamentali ovvero:

- Sistema fluidico: consente di trasportare il campione con focalizzazione idrodinamica mediante l'uso del *sheath fluid*, che ha il compito di creare una guaina e rivestire le cellule per creare un flusso lineare. All'interno del macchinario ci sono una serie di canalicoli che convogliano le cellule. Lo strumento si avvale anche di due taniche una di *sheath fluid* e una di *waste*. In quest'ultima viene riversato il campione con il fluido precedentemente citato post-acquisizione. È fondamentale evitare l'ingresso di aria all'interno della

macchina. Dopo l'accensione si devono effettuare lavaggi con soluzioni apposite (solitamente ipoclorito) per eliminare i residui di campioni delle acquisizioni precedenti.

- Sistema ottico: comprende i laser come fonte di luce e un sistema di indirizzamento dei fasci luminosi mediante l'utilizzo di specchi e prismi per convergere il raggio luminoso ai rivelatori fotomoltiplicatori. I sette laser che sono normalmente presenti hanno delle lunghezze d'onda diverse. Il citofluorimetro adoperato per l'analisi delle metodiche sopracitate è il BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer di BD Bioscience (Milano, Italy) che presenta 5 laser con le seguenti lunghezze d'onda: <sup>36</sup>

Tabella 4 Laser FACSymphony A5 Cell Analyze, Bioscience, Milano, Italy. Fonte: <https://www.bdbiosciences.com/en-pl/products/instruments/flow-cytometers/research-cell-analyzers/bd-facsymphony-a5>

LASER	LUNGHEZZA D'ONDA	POTENZA (mW)
UV	355 nm	20-100
Violetto	405 nm	100-200
Blu	488 nm	100-200
Giallo-verde	561 nm	100-200
Rosso	637 nm	140

Inoltre, sono presenti anche delle lenti che sfruttano la dispersione della luce per valutare il marcatore in analisi.

- Sistema elettronico: è costituito da un convertitore *software* digitale. Esso viene installato su un computer ed è adibito alla gestione e all'interpretazione dei dati analitici in digitale (convertitore analogico-digitale ADC).

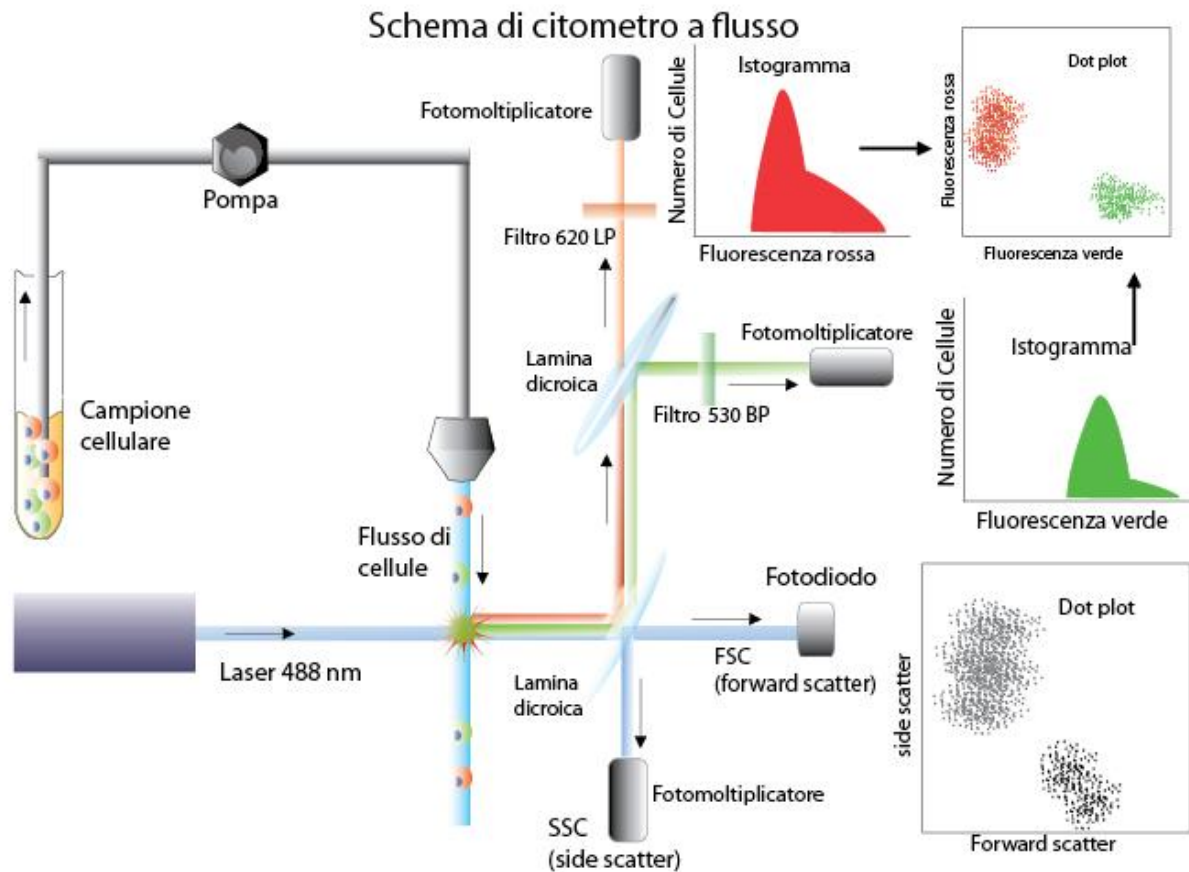


Figura 8 Illustrazione delle componenti e del flusso di lavoro del citofluorimetro. Fonte: <http://biologa.altervista.org/laboratorio-analisi/citometria-a-flusso>.

Mediante l'utilizzo di un ago aspirante le cellule, in una condizione di vuoto e secondo un flusso laminare, vengono trasportate dallo *sheath fluid* nel sistema fluidico dove vengono allineate (focalizzazione idrodinamica) per una rapida acquisizione dei campioni.

Si ha poi la componente ottica dei laser, una serie di fotomoltiplicatori, lenti e filtri che sfruttano la dispersione della luce e sono in grado di eccitare i fluorocromi del campione. L'emissione dei segnali di fluorescenza viene captata da sensori, convertita in segnali elettrici e convogliati in un computer che permette la visualizzazione percentuale delle cellule di una popolazione.

Nel sistema ottico vengono valutati due parametri fondamentali:

- Parametri fisici tramite *light-scattering*: misura fisica di grandezza/volume FSC e granulosità SSC. Le modalità con cui la luce viene distribuita sulla stessa linea del fascio quindi mediante una dispersione frontale (*forward scatter*, FSC) o laterale (*side scatter* o dispersione laterale, SSC) sono in grado di fornire all'operatore numerose informazioni circa le dimensioni o la complessità della cellula. L'FSC viene riportato sull'asse delle x in un grafico in cui viene messo in relazione con l'SSC che definisce il rapporto nucleo/citoplasma, granulosità interna e rugosità della membrana (asse delle ordinate). Questo test viene chiamato "*densitometry plot*".
- Fluorescenza: il fluorocromo emette a una  $\lambda$  maggiore rispetto a quella di eccitazione. Tra i fluorocromi più interessanti annoveriamo il FITC che emette a lunghezze d'onda attorno ai 510-520 nm e il PE a 580 nm, mentre per PE-cy7 l'emissione avverrà sui 800 nm. È possibile discriminare i picchi in emissione, tuttavia, le code dei picchi possono sovrapporsi rendendo l'indagine più complessa, motivo per cui si ricorre all'utilizzo di una metodica definita compensazione.

I vantaggi di questa tecnica sono molteplici come:

- Multiparametricità, cioè possibilità di mettere in relazione più caratteristiche della stessa cellula (anche fino a 20 parametri contemporaneamente).
- Analisi di grandi quantità di cellule.
- Relazione lineare tra segnale misurato e concentrazione dell'analita in esame.
- Riproducibilità ed affidabilità statistica delle acquisizioni.
- Grande sensibilità.
- Rapidità di analisi.

Lo svantaggio è legato al fatto che è una metodica complessa per cui subentrano delle difficoltà nell'analisi che richiedono un operatore competente dello strumento.<sup>37</sup>

### **3.4 Staining dei linfociti T senescenti ed esausti**

La metodica di staining dei linfociti T è stata eseguita mediante l'utilizzo di anticorpi coniugati a specifici fluorocromi per permettere la rivelazione citofluorimetrica al fine di evidenziare le componenti leucocitarie, in particolari linfociti T senescenti ed esausti.

In questa tesi abbiamo usato il seguente protocollo:

#### 1. Preparazione dei tubes per citofluorimetria (BD Bioscience, Milano, Italy)

- Per ogni campione sono stati allestiti due tubes, opportunamente segnati con il codice del paziente e la specifica delle marcature usate nel tube stesso: UNS (*unstained*) per il tube contenente solo il sangue periferico (SP), che serve come controllo per l'autofluorescenza delle cellule stesse, e "ALL", per definire il tube contenente cellule e anticorpi marcati.

#### 2. Preparazione dei campioni

- Mettere 200  $\mu$ L di sangue dalla provetta del prelievo per ciascuna delle tubes (UNS e ALL); .
- Aggiungere 1 mL di *Staining buffer* (3% FBS, 1x PBS) a ciascuna delle tubes

Il *Fetal Bovine Serum* (FBS, Biosgima, Verona, Italy) ha la funzione di agente bloccante, prevenendo legami non specifici e migliorando la specificità dei legami antigene-anticorpo. Inoltre, stabilizza le condizioni del tampono.

Il *Phosphate Buffer Saline* (PBS, Biosigma, Verona, Italy) è una soluzione tampone utilizzata per mantenere il pH e la stabilità delle cellule o dei tessuti durante le analisi; esso coadiuva l'attività svolta dall'FBS e attenua il rumore di fondo causato dai legami non specifici. L'utilizzo di FBS e PBS garantisce risultati più affidabili e accurati.

#### 3. Centrifugazione

- Centrifugare i campioni a 400G per 10 minuti a temperatura ambiente con una accelerazione pari a 9 e una decelerazione pari a 9. La centrifuga in uso per questa metodica è: Thermo Fisher Scientific™ Centrifughe Megafuge™ serie 16 W altam, (Massachusetts, USA).

4. Rimozione del surnatante
  - Eliminare il surnatante all'interno di un *waste* dedicato ai campioni biologici con un movimento costante al fine di evitare il distacco del *pellet* cellulare dalla parete dei *tubes*.
5. Risospensione del pellet
  - Risospendere il *pellet* in 100 µL di *Staining buffer* (3% FBS, 1XPBS)
6. Aggiunta del *Viability Dye*™ (FV 780)
  - Aggiungere 0,5 µL di *Viability Dye*™ (FV 780, BD Bioscience, Milano, Italy) in entrambi i *tubes*  
Il *Viability Dye* è un colorante che permette di valutare la vitalità delle cellule. Le cellule non vitali hanno una membrana cellulare compromessa che consente al colorante di entrare all'interno delle cellule, rendendole quindi distinguibili al citofluorimetro.
7. Incubazione
  - Incubare i *tubes* per circa 15 minuti a temperatura ambiente, ma protetti da fonti di luce diretta in quanto il *Viability Dye*™ (FV 780, BD Bioscience, Milano, Italy) è estremamente fotosensibile.
8. Lavaggio dei campioni
  - Dispensare all'interno delle provette un volume di *Staining Buffer* pari a 1 mL per ogni *tubes*.
  - Centrifugare il campione a 400G per 10 minuti a temperatura ambiente con una accelerazione pari a 9 e una decelerazione pari a 9.
  - Eliminare il surnatante all'interno di un *waste* dedicato ai campioni biologici mediante un movimento costante al fine di evitare il distacco del *pellet* cellulare dalla parete delle *tubes*.
9. Preparazione finale dei campioni
  - Risospendere il *pellet* in 100 µL di *Staining buffer* (3% FBS, 1XPBS)
  - Aggiungere solo nel tube "ALL" gli anticorpi come da tabella sotto riportata (Tabella 5).

Gli anticorpi per questa metodica sono stati prodotti dall'azienda BD Bioscience, Milano, Italy e da Prodotti Gianni, Milno, Italy.



Tabella 5 . Marcatori fluorescenti con funzione e quantità per l'analisi al citofluorimetro

ANTICORPO	FUNZIONE	FLUOROFORO	QUANTITÀ
KLRG1 (13F12F2)	Marcatore dei linfociti T senescenti	PE	1 µL
PD-1 (MIH4)	Marcatore dei linfociti T esausti	BV650	1 µL
TIGIT (741182)	Marcatore dei T esausti	BB700	1 µL
LAG-3 (T47-530)	Marcatore dei T esausti	BV480	1 µL
CD45 (HI30)	Marcatore pan leucocitario	BUV395	0,5 µL
CD8 (RPA-T8)	Marcatore dei T citotossici e dei Natural Killer	BUV496	1 µL
CD4 (SK3)	Marcatore dei linfociti T helper	FITC	1 µL
CD57 (NK1)	Marcatore dei linfociti T senescenti	BV421	0,5 µL
CD3 (SK7)	Marcatore dei linfociti T	BV786	1 µL
CD28 (CD28.2)	Marcatore dei linfociti T attivati	APC-R700	2 µL

#### 10. Seconda incubazione

- Incubare i tubes per circa 15 minuti a temperatura ambiente, ma protetti da fonti di luce diretta in quanto i fluorofori risultano essere estremamente fotosensibili.

#### 11. Aggiunta del *Lysis Buffer*

- aggiungere 3 mL di *Lysis Buffer 1x* per ciascun *tubes*.

Il *Lysis Buffer 1x* (BD Bioscience, Milano, Italy). La soluzione di lisi per globuli rossi lisa selettivamente gli eritrociti lasciando i leucociti vitali e morfologicamente non alterati.

#### 12. Incubazione per lisi degli eritrociti

- Incubare la soluzione cellulare ottenuta per 15 minuti al fine di garantire la completa eliminazione degli eritrociti.

#### 13. Centrifugazione

- Centrifugare il campione a 400G per 10 minuti a temperatura ambiente con una accelerazione pari a 9 e una decelerazione pari a 9

#### 14. Rimozione del surnatante

- Eliminare il surnatante all'interno di un *waste* dedicato ai campioni biologici mediante un movimento costante al fine di evitare il distacco del *pellet* cellulare dalla parete delle *tubes*.

#### 15. Ripetizione della lisi, se necessario

- Ripetere i passaggi per la lisi qualora il campione risultasse avere ancora una colorazione rossa intensa, indice della presenza di eritrociti rimanenti.

#### 16. Risospensione finale del pellet

- Risospendere il *pellet* in 300  $\mu$ L di *Staining buffer* (3% FBS, 1XPBS).

#### 17. Acquisizione al citofluorimetro

- Acquisire al citofluorimetro (BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer, BD Bioscience, Milano, Italy).

### **3.5 Gating strategy linfociti T senescenti ed esausti**

L'analisi dei linfociti T senescenti ed esausti, è stata eseguita in citofluorimetria utilizzando un pannello di marcatori specifici associati a fluorocromi.

I linfociti T senescenti sono caratterizzati dalla presenza o dalla assenza di marcatori sulla loro superficie, come inespressione di CD28 ed espressione di KLRG1+ e CD57+ che ne consentono l'isolamento della popolazione di cellule in questione. L'espressione del fenotipo senescente è ulteriormente confermata mediante la presenza del marker KLRG1 e CD57+

I linfociti esausti, sono caratterizzati dall'espressione di PD-1, LAG-3 e TIGIT e dalla mancata espressione di CD28.

In questa tesi abbiamo utilizzato la seguente strategia di *gate*, dove per "*gate*" si intende la regione definita in grafici a una o due dimensioni, che possono essere definite sequenzialmente in base all'intensità di fluorescenza, creando una serie di estrazioni di sottoinsiemi:

1. Selezione delle cellule
  - Gate morfologico, utilizzando in un plot a due dimensioni i parametri fisici Forward Scatter (FSC) e Side Scatter (SSC), in modo da indentificare le sottopopolazioni linfocitarie in base alle loro dimensioni (FCS) e compelssità (SSC)
  - I Gate "Singoletti", dove uno stesso parametro fisico viene difinito in base a due dimensioni: FSC-A (A=Area) vs FSC-H (H=Height); questo permette di escludere dall'analisi i cluster di più cellule-anticorpo.
2. Esclusione delle cellule morte
  1. Viability Dye vs. SSC-A, dot-plot per escludere le cellule morte, positive alla sonda, e quindi selezionare solo le cellule vive che sono negative per la stessa.
3. Selezione dei linfociti, utilizzando il marcatore CD45 Pan-Linfocitario
  - dot-plot SSC-A vs CD45+, la selezione verrà fatta sulle cellule che risultano SSC-A<sup>low</sup>CD45<sup>high/++</sup> .
4. Identificazione dei linfociti T
  - CD3 vs. SSC-A, dot-plot che permette di identificare le cellule i linfociti T, CD3+;

- CD4 vs. CD8, dot-plot che permette di identificare i linfociti T helper che sono CD3+ e CD4+ e i linfociti T citotossici che sono CD3+ e CD8+ .
5. Identificazione delle cellule CD4+ o CD8+ attivate, CD28+
- CD28 vs CD4 o CD8, dot-plot per indetificare le cellule T CD28+CD4+/CD8+ attive e CD28- non attive
6. Identificazione delle cellule senescenti
- KLRG1 vs. CD57 dove si crea un plot che permette di identificare le cellule senescenti che tipicamente sono KLRG1+ e CD57+
7. Identificazione delle cellule esauste
- PD-1 vs. LAG-3 dot-plot che permette l'identificazione di cellule esauste che tipicamamente sono PD-1+ e LAG3+ .
  - PD-1 vs SSC-A dot-plot che permette l'indificazione di cellule esauste che tipicamente sono PD-1+
  - TIGIT vs SSC-A dot-plot che permette l'indificazione di cellule esauste che tipicamente sono TIGIT+
  - LAG3 vs SSC-A dot-plot che permette l'indificazione di cellule esauste che tipicamente sono LAG3+

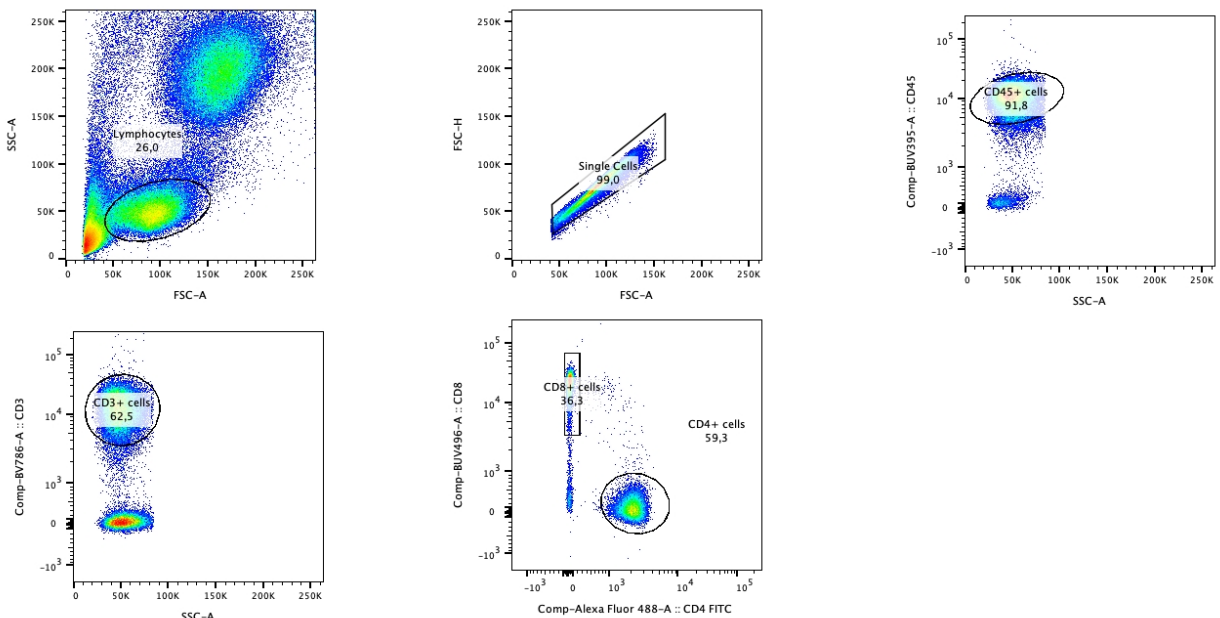


Figura 9: Gating Strategy per l'individuazione di cellule CD3+, CD4+ e CD8+, immagine acquisita al BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer

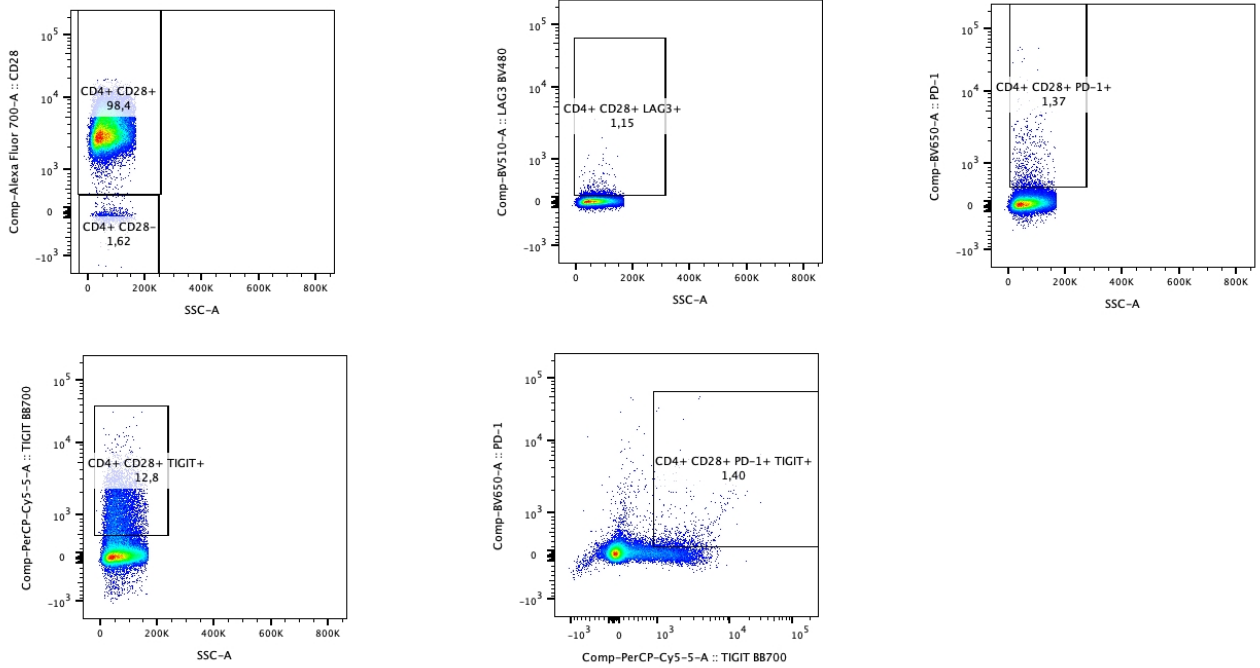


Figura 10 Gating Strategy per identificazione delle cellule esauste CD28+ mediante marcatori TIGIT ,LAG3+ e PD-1, immagine acquisita al BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer 1.

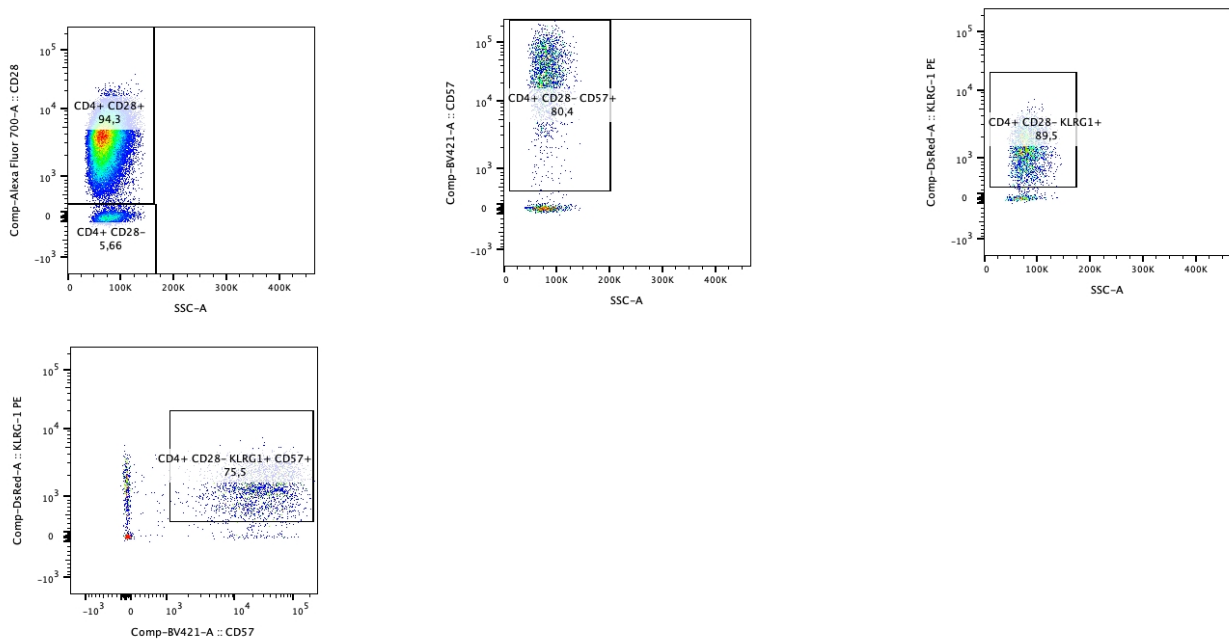


Figura 11 Gating Strategy per l'identificazione di cellule senescenti CD28- mediante l'utilizzo di marcatori CD57+, KLRG-1+, immagine acquisita al BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer

Le immagini illustrano la *Gating Strategy* al fine di isolare le popolazioni di cellule senescenti ed esauste CD3+, ma la stessa tecnica è applicata anche alle popolazioni di CD4+ e CD8+.

La metodica consente quindi di identificare le popolazioni di linfociti T senescenti ed esausti fornendo informazioni dettagliate sulla condizione immunitaria del paziente.

## **2.6 Isolamento di Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)**

Una delle metodiche più utilizzate in un laboratorio di immune-oncologia consiste nell'isolamento degli elementi cellulari mononucleati da sangue venoso periferico, noti come PBMC. I linfociti sono stati purificati da prelievi di sangue venoso eparinato tramite la stratificazione operata con Ficoll/Hypaque (F/H) (Amersham Biosciences; San Francisco, California), un polimero sintetico ramificato derivato da saccarosio ed epicloridina ad elevato peso molecolare ed estremamente idrosolubile. Questa tecnica sfrutta la diversa densità delle cellule mononucleate (linfociti e monociti) rispetto agli altri elementi corpuscolati del sangue. Infatti, le cellule mononucleate e le piastrine, che presentano una minore densità, si concentrano sopra lo strato di F/H; viceversa, i globuli rossi ed i granulociti si raccolgono sul fondo della provetta.

Tale processo viene eseguito sempre nel rispetto delle norme di sicurezza e sterilità, mediante l'utilizzo di una cappa BioHazard di classe II con sistemi di flusso laminare (DASIT GROUP™, SafeFAST Elite™).

### 1) Preparazione del campione

- Trasferire il campione all'interno di una *Falcon da 50mL*, sul quale sono riportati il codice del paziente e la data dell'analisi.
- Lavare accuratamente le *Vacutainer®* tramite pipetta sierologica per raccogliere il maggior volume possibile di campione biologico.
- Diluire il sangue 1:3 aggiungendo sodio cloruro 0.9% (soluzione fisiologica) e miscelare il contenuto.

### 2) Separazione per gradiente di densità

- Aggiungere 15 mL di *Ficoll™* alla *Falcon* contenente la miscela di sangue diluito. Il *Ficoll* viene depositato sul fondo della *Falcon* tramite un pipettatore automatico in maniera omogenea e continua, al fine di non alterare l'omeostasi cellulare.
- Centrifugare il campione a 550 x g per 20 minuti con una accelerazione pari a 7 e una decelerazione pari a 0 per garantire una corretta separazione degli elementi. La centrifuga in uso per questa metodica è: Thermo Scientific™ Centrifughe Megafuge™ serie 16.

### 3) Lavaggio e risospensione delle cellule

- Prelevare l'interfase o "cloudy ring" mediante l'utilizzo di un pipettatore automatico e trasferirla all'interno di una nuova *Falcon* da 50 mL come riportato nella Figura 12. Aggiungere la soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) e centrifugare il campione a 900 x g 10 minuti con una accelerazione pari a 9 e una decelerazione pari a 9.

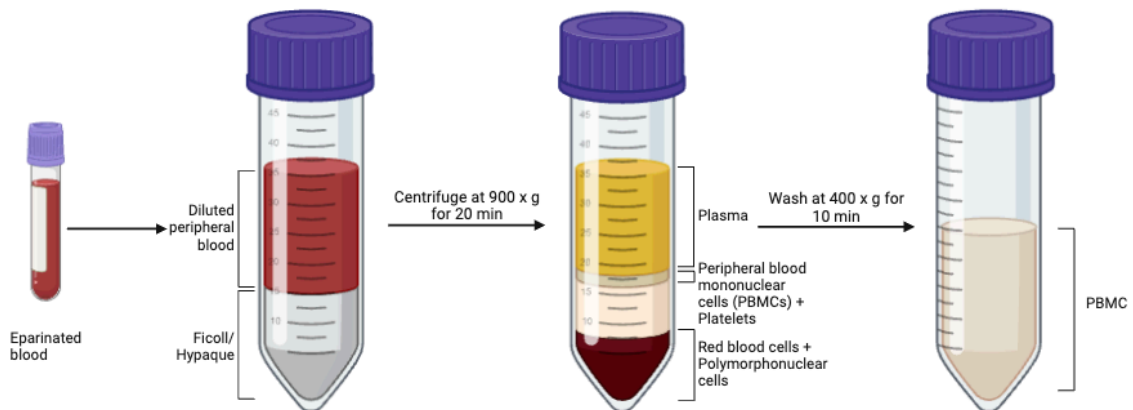


Figura 12 Separazione per gradiente tramite Ficoll/Hypaque. L'immagine illustra le tappe fondamentali per la separazione di sangue periferico eparinato: in primo luogo, l'aggiunta di Ficoll alla soluzione diluita seguita dalla centrifugazione della stessa. Il cloudy ring viene poi prelevato tramite l'ausilio di un pipettatore automatico e trasferito all'interno di una *Falcon* da 50 mL a cui viene aggiunto sodio cloruro 0.9% e sottoposto ad un'ulteriore lavaggio. Creata con: BioRender.

- Eliminare il surnatante ed evitare il distacco del *pellet* cellulare dalla parete della *Falcon*.
- 4) Lisi cellulare
- Risospendere il *pellet* in 1 mL di soluzione fisiologica (NaCl 0.9%), miscelandolo accuratamente.
  - Aggiungere una quantità variabile di *Lysis Buffer 1x* in base alla colorazione del *pellet*. Una colorazione intensa richiede un volume maggiore di buffer. Il *Lysis Buffer 1x* rompe le membrane cellulari per liberare DNA, RNA e proteine.
  - Incubare la soluzione per 10 minuti per garantire la completa lisi degli eritrociti intrappolati nel *pellet* cellulare.
- 5) Lavaggio e risospensione delle cellule
- Centrifugare il campione a 400 x g 10 minuti con una accelerazione pari a 9 e una decelerazione pari a 9.
  - Eliminare il surnatante mediante un movimento costante per evitare il distacco del *pellet* cellulare dalla parete della *Falcon*.



## 6) Conta cellulare

- Risospendere il *pellet* in 1 mL di soluzione fisiologica (NaCl 0.9%), miscelandolo accuratamente.
- Preparare 90  $\mu$ L di *TURK solution* in un pozzetto di una piastra da coltura 96 *pozzetti*. Questa soluzione è composta da una miscela di alcol etilico, acido acetico, glicerolo e fenolo, permette la colorazione delle cellule leucocitarie, rendendo più semplice la conta delle singole cellule vive.
- Prelevare 10  $\mu$ L di PBMCs, aggiungerli al pozzetto contenente il colorante e risospendere vigorosamente la soluzione.
- Trasferire 10  $\mu$ L di soluzione all'interno di un vetrino con reticolo per definire la concentrazione di cellule vive presenti. Utilizzando un microscopio ottico e una camera di Burker, si procede con il conteggio. È necessario contare almeno 3 quadranti preferibilmente in diagonale. Le cellule lungo i due margini selezionati vengono conteggiate, successivamente si procede con la conta di quelle all'interno del quadrante. Infine, si calcola la media delle cellule contate all'interno dei quadranti e si moltiplica il risultato per il fattore di diluizione ( $10^4$ ).
- Suddividere le PBMCs per ulteriori analisi (paragrafi 3.5 e 3.6), come lo *staining* delle MDSC, oppure conservarle a basse temperature utilizzando il dimetilsolfossido (DMSO).

### **3.7 Staining di Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSCs)**

Per la caratterizzazione delle MDSC, abbiamo utilizzato dei marcatori specifici che sono descritti nella Tabella 6.

Per ogni paziente abbiamo seguito il seguente protocollo:

1) Preparazione dei FACS tubes:

Preparare due FACS *tubes*: uno come controllo per l'autofluorescenza delle cellule (denominato UNS) ed uno in cui verranno aggiunti tutti gli anticorpi per la caratterizzazione delle MDSC (definito MDSC). Ciascun *tubes* sarà contrassegnato anche dal codice del paziente e dalla data di processamento.

Per ogni *tubes*

verranno marcati 1 milione di PBMC.

2) Lavaggio e risospensione delle cellule

- Dispensare un volume di soluzione fisiologica NaCl 0.9% pari a 1 mL in ciascun *tube* e porre in centrifuga. La centrifuga in uso per questa metodica è: Thermo Fisher Scientific™ Centrifughe Megafuge™ serie 16 W altam, (Massachusetts, USA).
- Centrifugare il campione a 400G per 10minuti a temperatura ambiente con una accelerazione pari a 9 e una decelerazione pari a 9.
- Rimuovere il surnatante all'interno di un *waste* dedicato ai campioni biologici mediante un movimento costante al fine di evitare il distacco del *pellet* cellulare dalla parete delle *tubes*.
- Risospendere il *pellet* in 100 µL di *Staining Buffer* (3% FBS e 1% PBS). Il *Phosphate Buffer Saline* (PBS) è una soluzione tampone utilizzata per mantenere il pH e la stabilità delle cellule o dei tessuti durante le analisi; esso coadiuva l'attività svolta dall'FBS e attenua il rumore di fondo causato dai legami non specifici. L'utilizzo di FBS e PBS garantisce risultati più affidabili e accurati.

### 3) Marcatura delle MDSCs

- Aggiungere nel *tube* "MDSC" i seguenti anticorpi:

Tabella 6 marcatori citofluorimetrici impiegati nello staining per le MDSC.

ANTICORPO	FUNZIONE	FLUOROFORO	QUANTITÀ
CD45 (HI30)	Marcatore leucociti	BUV395	0,5 µL
LOX-1 (15C4)	Marcatore Monociti attivati	PE	1 µL
HLA-DR (G466)	Marcatore caratterizzazione leucociti	BV605	1 µL
CD15 (W6DR)	Marcatore linea mieloide	BV510	1 µL
CD14 (M5E2)	Marcatore monociti	BUV737	0,5 µL
CD33 (CD33.4)	Marcatore linea mieloide	APC	5 µL

- Incubare per 20 minuti a temperatura ambiente, protetti da fonti di luce diretta in quanto i fluorofori risultano essere estremamente fotosensibili.

### 4) Lavaggio e risospensione delle cellule

- Dispensare all'interno delle provette un volume di *Staining Buffer* pari a 1 mL per ogni *tube*.
- Centrifugare il campione a 400G per 10 minuti a temperatura ambiente con una accelerazione pari a 9 e una decelerazione pari a 9.
- Eliminare il surnatante all'interno di un *waste* dedicato ai campioni biologici mediante un movimento costante al fine di evitare il distacco del *pellet* cellulare dalla parete delle *tubes*.
- Risospendere il *pellet* in 200 µL di *Staining Buffer* (3% FBS e 1% PBS).

## 5) Citofluorimetria

- Acquisire le cellule marcate con gli anticorpi al citofluorimetro (BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer, BD Bioscience), usando “full power” come settaggio dei laser (Paragrafo 3.7)

### **3.8 Gating strategy per MDSCs**

Le cellule mieloidi soppressorie (MDSC) costituiscono un gruppo eterogeneo di cellule soppressorie che svolgono una funzione nella modulazione negativa della risposta immunitaria.

Di seguito è descritta la gating strategy:

1. Esclusione dei detriti/cellule morte
  - *Forward Scatter* (FSC-A) vs. *Side Scatter* (SSC-A): dot-plot che identifica le popolazioni in base a dimensione e complessità cellulare. Esclusione dei doppietti
  - *Side Scatter Area* (SSC-A) vs. *Side Scatter Height* (SSC-H) Identificazione delle sottopopolazioni linfocitarie
2. SSC-A vs CD45: permette di identificare i linfo-monociti sulla base di un parametro fisico e di un marcatore immunologico. Identificazione delle MDSC totali e sub-popolazioni:
  - CD14 vs HLA-DR: identificazione della popolazione monocitaria
  - CD14+HLA\_DR+ e di quella delle MDSC di origine monocitaria (M-MDSC)
  - CD14+HLA-DR-
3. CD15 vs CD33: identificazione della popolazione MDSC di origine polimorfonucleati (PMN-MDSC) CD15+CD33<sup>int</sup>
  - SSC-A vs LOX-1: identificazione della sottopopolazione di PNM-PBMC LOX-1+, CD15+CD33<sup>int</sup>LOX-1+

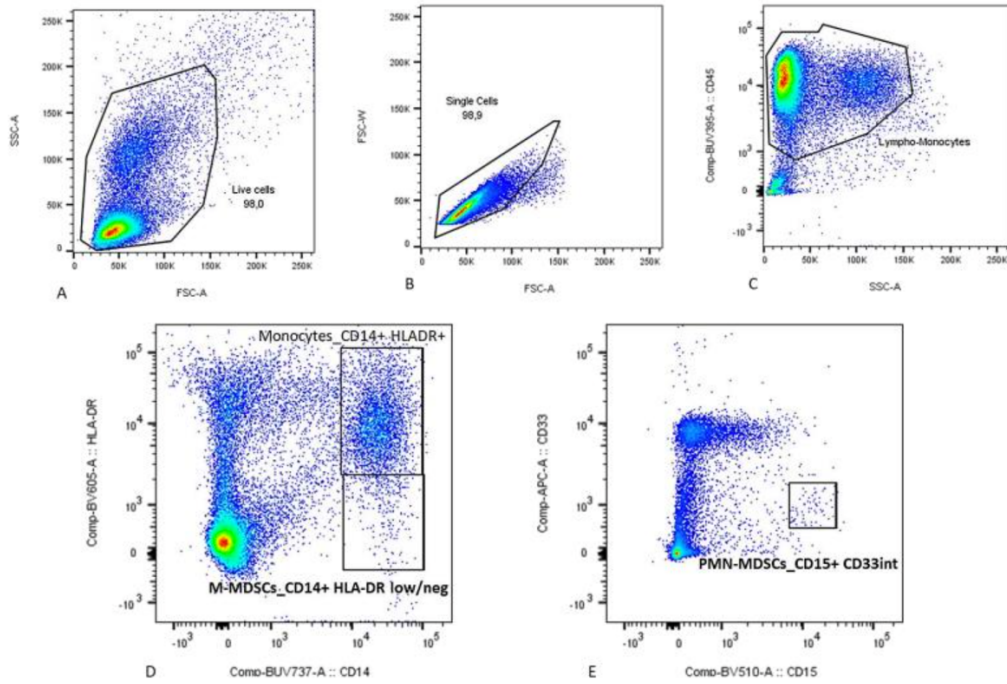


Figura 13 Gating strategy per M-MDSC e PMN-MDSC caratterizzate partendo da PBMCs. L'immagine rappresenta i "dot plots" per questa metodica, immagine acquisita al BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer

### **3.9 Analisi statistiche**

L'analisi statistica della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T senescenti ed esausti e delle MDSC nei vari sottogruppi di pazienti analizzati è stata eseguita utilizzando il test non parametrico di Mann-Whitney U e di Kruskal-Wallis. I dati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard (ES) della media. Il ruolo prognostico delle sottopopolazioni di cellule MDSC e delle sottopopolazioni di linfociti T circolanti è stato valutato analizzando la loro associazione con la sopravvivenza libera da progressione (PFS). Per l'analisi di sopravvivenza sono state utilizzate curve di sopravvivenza Kaplan-Meier, il test del *log-rank*. I dati sono stati considerati statisticamente significativi solo per valori con  $p < 0,05$  o  $p < 0,01$ . Il software Graph-Pad Prism V10 è stato utilizzato come programma di analisi statistica.

### **3.10 Ritiro del paziente dallo studio:**

I pazienti possono rimanere nello studio se non avviene uno dei seguenti eventi:

- Ritiro del consenso, in questo caso nessun'altra valutazione sarà effettuata e la raccolta di dati verrà interrotta
- Non-compliance del paziente

## 4. Risultati

### **4.1 Tabella descrittiva della popolazione in studio.**

Lo studio comprende 73 pazienti, le cui caratteristiche sono riassunte nella Tabella 7. La mediana dell'età della popolazione è di 55 anni, con un intervallo di valori compreso tra 34 e 83 anni.

Per quanto riguarda il peso corporeo, il BMI medio è pari a 24,6 kg/m<sup>2</sup> con un range di valori compreso tra 17,51-38,28.

Il 65,83 % dei pazienti arruolati ha una relazione di familiarità con una malattia neoplastica, mentre solo una piccola percentuale presenta una mutazione BRCA 1-2 (n=7; 9,58%).

La tipologia di cancro più comune dal punto di vista istopatologico è il carcinoma duttale infiltrante (n=37 50,68%), seguito dal carcinoma invasivo (n=21; 28,76%), carcinoma infiltrante non specifico (NCS) (n= 13; 17,80%), carcinoma scarsamente differenziato (n=1; 1,36%) e carcinoma metaplastico (n=1; 1,36%)

I pazienti sono stati divisi in 3 gruppi: HER2+, in base all'espressione del recettore del fattore di crescita epiteliale, Triplo Negativo (TNBC) e ER+/- . Il sottotipo molecolare più frequente è HER2+ (n=29; 39,72%), seguito da TNBC (n=28; 38,35%) ed infine ER+ (n=16; 21,91%).

La media di espressione di Ki-67 è di 50,3%, indice di velocità di espansione neoplastica, mentre l'espressione di PGR è di 0%.

La maggior parte dei pazienti ha grado G3 (n= 61; 83,56%), mentre i pazienti di grado G2 sono presenti in misura minore (n= 11; 15,06%).

Considerando che la presenza di metastasi è un criterio di esclusione per l'arruolamento dei pazienti all'interno dello studio, la maggior parte dei pazienti hanno un TMN score pari a T2 N0 (32,87%) e T2 N1 (29,76%).

Tabella 7 Caratteristiche cliniche dei pazienti in studio.

CARATTERISTICHE	POPOLAZIONE IN STUDIO NUMERO TOTALE: 73	VALORE MEDIO
ETÀ		55 (34-83)
BMI		24,6 (17,51-38,28)
<b>FAMIGLIARITA'</b>		
SI	48 (65,83%)	
NO	24 (32,87%)	
NON INDICATO	1 (1,36%)	
<b>MUTAZIONE BRCA1-2</b>		
SI	7 (9,58%)	
NO	36 (49,31%)	
NON INDICATO	30 (41,09%)	
<b>GRADO ISTOLOGICO</b>		
G2	11 (15,06%)	
G3	61 (83,56%)	
NON INDICATO	1 (1,36%)	
<b>SOTTOTIPI MOLECOLARI</b>		
TNBC	28 (38,35%)	
HER2+	29 (39,72%)	
ER+	16 (21,91%)	
<b>ESPRESSIONE KI-67</b>		50,3% (10%-90%)
<b>ESPRESSIONE PGR</b>		0% (0%-100%)
<b>TNM</b>		
TX N2	1 (1,36%)	
T1 N0	1 (1,36%)	
T1 N1	6 (8,21%)	
T1 N2	2 (2,73%)	
T2 N0	21 (29,76%)	
T2 N1	24 (32,87%)	
T2 N2	1 (1,36%)	
T2 N3	1 (1,36%)	
T3 N0	5 (6,84%)	
T3 N1	3 (4,10%)	
T3 N2	2 (2,73%)	
T3 N3	1 (2,73%)	
T4 N0	2 (2,73%)	
T4 N1	1 (1,36%)	
T4 N2	0 (0%)	
T4 N3	1 (1,36%)	
NON INDICATO	1 (1,36%)	
<b>PCR</b>		
SI	37 (50,68%)	
NO	31 (42,46, %)	
NON INDICATO	5 (6,84 %)	
<b>TIPOLOGIA ISTOPATOLOGICA</b>		
CARCINOMA DUTTALE INFILTRANTE	37 (50,68%)	
CARCINOMA INFILTRANTE NCS	13 (17,80%)	
CARCINOMA INVASIVO	21 (28,76%)	
CARCINOMA METAPLASTICO	1 (,36%)	
CARCINOMA SCARSAMENTE DIFFERENZIATO	1 (1,36%)	

BMI: Body Mass Index

BRCA 1-2: Breast Cancer gene 1

ER+: Estrogen Receptor +

HER2+: Human Epidermal Growth Factor 2+

TN: Triple Negative

PGR: Progesterone Receptor

TNM: Tumor, Node, Metastasis

PCR: Pathological Complete Response



## **4.2 Caratterizzazione dei linfociti T senescenti ed esausti nei pazienti con tumore al seno prima dell'inizio della terapia (*baseline*)**

Al fine di caratterizzare i linfociti T senescenti ed esausti nei sottotipi di tumore al seno, mediante citometria a flusso abbiamo valutato la frequenza dei linfociti T senescenti ed esausti (in termini di percentuale) (*baseline*) in 27 pazienti, di cui 8 a fenotipo HER2+, 10 TNBC e 9 ER+, prima dell'inizio della terapia (*baseline*).

Per ogni sottotipo (TNBC, HER2+ e ER+) abbiamo valutato la frequenza dei linfociti T CD3, *helper* (CD4), citotossici (CD8), e relativi marcatori di *exhaustion* (PD-1, LAG3 e TIGIT) e di senescenza (CD57 e KLRG-1), in modo da valutare eventuali differenze tra i pazienti con tumore a prognosi più o meno sfavorevole.

In tabella 8 sono riportati i valori di media, SD e p value dei confronti fatti (Tabella 8, *Dunn's multiple comparison test*) mentre in Figura 14, 15, 16, 17, 18 e 19 sono riportati i grafici in dettaglio per ogni sottopopolazione analizzata.

I dati dimostrano che il gruppo di pazienti con il sottotipo molecolare più aggressivo TNBC hanno una significativa maggior frequenza di linfociti T citotossici con fenotipo senescente (CD8+CD28-CD57+KLRG1+) rispetto al gruppo ER+ a prognosi più favorevole (Tabella 8, Figura 19 (D),  $8,428 \pm 5,601$ ; *Dunn's multiple comparison test*;  $P=0.05$ ).

Tabella 8 Tabella riassuntiva dei valori di p value (ER+ vs. HER2+; ER+ vs. TN; HER2+ vs. TN), media (ER+, HER2+, TNBC) e deviazione standard (ER+, HER2+, TNBC) delle sottopopolazioni di cellule T esauste e senescenti

POPOLAZIONE	Adjusted P value ER+ vs. HER2+	Adjusted P value ER+ vs. TN	Adjusted P value HER2+ vs. TN	Mean ER+	Mean HER2+	Mean TN	Std. Deviation ER+	Std. Deviation HER2+	Std. Deviation TN
CD3+	>0,9999	>0,9999	>0,9999	33,56	22,39	34,35	22,40	5,393	22,97
CD3+ CD28+	0,2701	0,6777	>0,9999	88,62	82,28	81,41	5,677	7,537	14,61
CD3+ CD28+ LAG3+	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,7330	0,4663	1,498	1,165	0,5926	3,531
CD3+ CD28+ PD-1+	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,3160	0,2791	0,3488	0,3727	0,2731	0,3729
CD3+ CD28+ TIGIT+	0,6040	>0,9999	>0,9999	6,409	8,381	7,663	3,068	2,696	4,122
CD3+ CD28+ PD-1+ TIGIT+	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,05411	0,07700	0,06500	0,04318	0,08953	0,07479
CD3+ CD28+ PD-1+ TIGIT+ LAG3+	0,4899	>0,9999	0,1968	0,02804	0,05300	0,01817	0,03158	0,06762	0,01742
CD4+	0,3379	0,5959	>0,9999	71,06	63,79	63,33	10,86	6,270	10,63
CD4+ CD28+	0,8960	>0,9999	>0,9999	64,39	60,16	61,24	10,32	5,372	10,54
CD4+ CD28+ LAG3+	>0,9999	>0,9999	0,3839	0,04478	0,06508	0,01917	0,07064	0,09727	0,01524
CD4+ CD28+ PD-1	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,4193	0,3913	0,4146	0,3944	0,2301	0,4267
CD4+ CD28+ TIGIT+	0,2004	0,6082	>0,9999	4,796	6,918	6,133	2,261	1,974	3,029
CD4+ CD28+ TIGIT+ PD-1+	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,03252	0,03779	0,03154	0,03634	0,04044	0,03289
CD4+ CD28+ TIGIT+ PD-1+ LAG3+	>0,9999	0,6552	0,7204	0,01256	0,02492	0,005793	0,01267	0,04700	0,007460
CD8+	0,3351	0,4261	>0,9999	23,26	30,41	31,54	9,547	7,122	11,44
CD8+ CD28+	>0,9999	>0,9999	>0,9999	17,32	17,76	16,75	8,271	7,054	7,253
CD8+ CD28+ PD-1+	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,1326	0,1368	0,1158	0,1447	0,1917	0,1158
CD8+ CD28+ TIGIT+	0,6058	0,5350	>0,9999	1,648	2,151	2,054	1,080	0,7051	0,8368
CD8+ CD28+ LAG3 +	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,04182	0,07325	0,08542	0,06181	0,1887	0,2049
CD8+ CD28+ TIGIT+ PD-1+	>0,9999	0,4827	>0,9999	0,006704	0,00925	0,0008338	0,01008	0,01794	0,002358
CD8+ CD28+ TIGIT+ PD-1+ LAG3+	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,005186	0,01621	0,006625	0,009357	0,03819	0,01011
CD3+ CD28-	0,1853	0,6462	>0,9999	10,81	17,46	17,94	5,421	7,541	13,91
CD3+ CD28- CD57+	0,3582	0,4391	>0,9999	5,744	11,89	14,16	3,807	6,956	11,85
CD3+ CD28- KLRG-1+	0,2779	0,2582	>0,9999	5,624	12,43	15,24	3,372	7,265	13,19
CD3+ CD28- CD57+ KLRG-1+	0,1681	0,1820	>0,9999	3,578	10,36	12,88	2,149	6,689	11,36
CD4+ CD28-	>0,9999	0,6291	0,4051	64,39	60,16	61,24	10,32	5,372	10,54
CD4+ CD28- CD57+	>0,9999	>0,9999	>0,9999	1,259	0,8700	0,9242	2,722	1,145	1,400
CD4+ CD28- KLRG-1+	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,8030	0,8129	0,9426	1,251	1,070	1,409
CD4+ CD28- KLRG-1+ CD57+	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,7878	0,8254	0,8601	1,410	1,124	1,361
CD8+ CD28-	0,1236	0,3619	>0,9999	5,612	12,59	14,46	3,050	6,582	13,12
CD8+ CD28- CD57+	0,1049	0,1469	>0,9999	3,228	9,656	12,00	1,887	6,166	11,47
CD8+ CD28- KLRG-1	0,0897	0,1068	>0,9999	2,943	10,24	13,38	1,883	6,152	12,91
CD8+ CD28- KLRG-1+ CD57+	0,0774	<b>0,0588</b>	>0,9999	2,332	8,428	11,53	1,733	5,601	11,26

## Popolazioni esaste

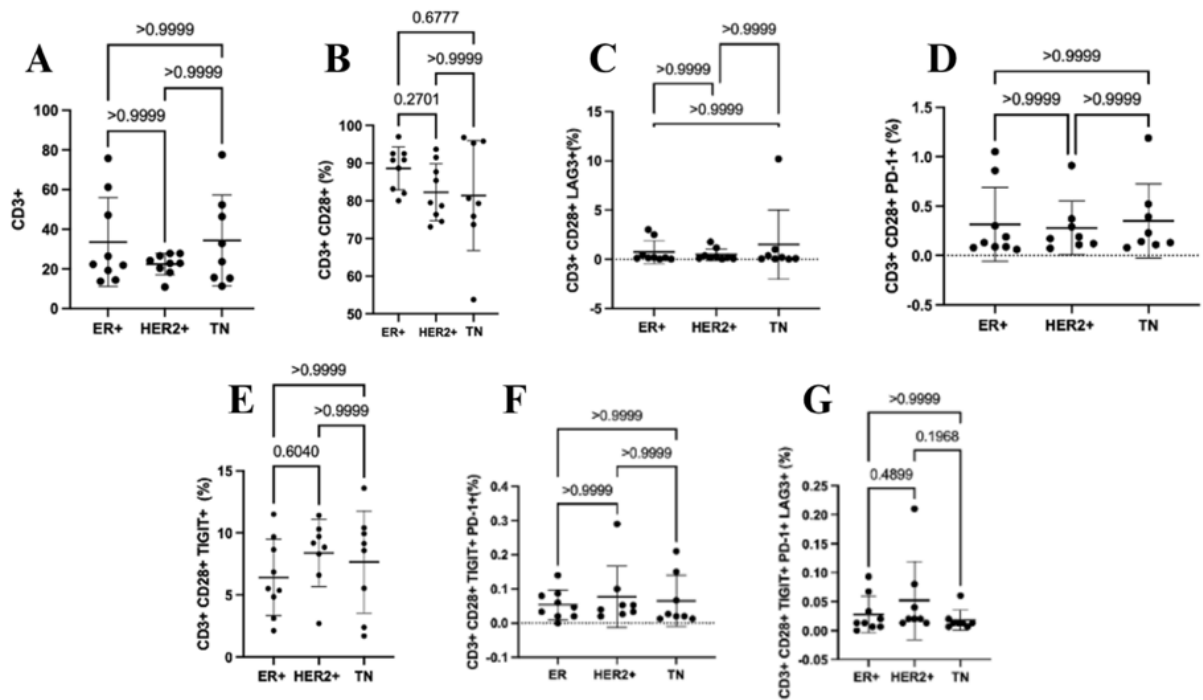


Figura 14 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD3+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline. Frequenza in termini di percentuale (%) di CD3+ (A), CD3+CD28+ (B), CD3+CD28+LAG3+ (C), CD3+CD28+PD1+ (D), CD3+CD28+TIGIT+ (E), CD3+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD3+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in TNBC (n=10), HER2+ (n=8) e ER+ (n=9).

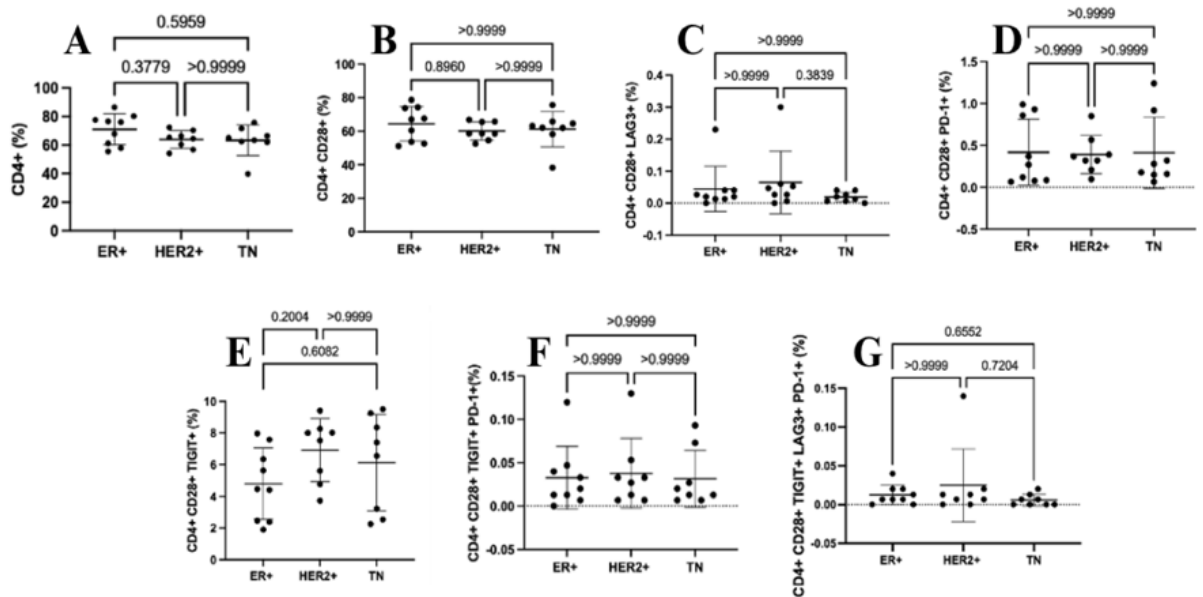


Figura 15 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD4+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline. Frequenza in termini di percentuale (%) di CD4+ (A), CD4+CD28+ (B), CD4+CD28+LAG3+ (C), CD4+CD28+PD1+ (D), CD4+CD28+TIGIT+ (E), CD4+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD4+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in TNBC (n=10), HER2+ (n=8) e ER+ (n=9).

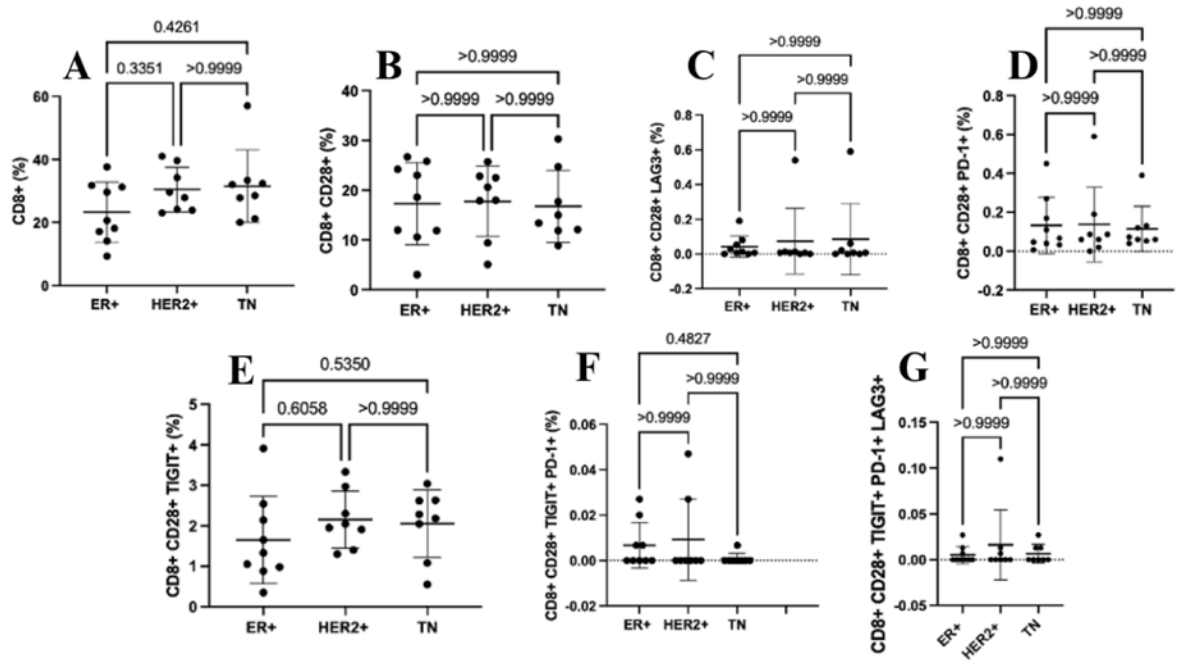


Figura 16 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD8+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline. Frequenza in termini di percentuale (%) di CD8+ (A), CD8+CD28+ (B), CD8+CD28+LAG3+ (C), CD8+CD28+PD1+ (D), CD8+CD28+TIGIT+ (E), CD8+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD8+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in TNBC (n=10), HER2+ (n=8) e ER+ (n=9).

## Popolazioni senescenti

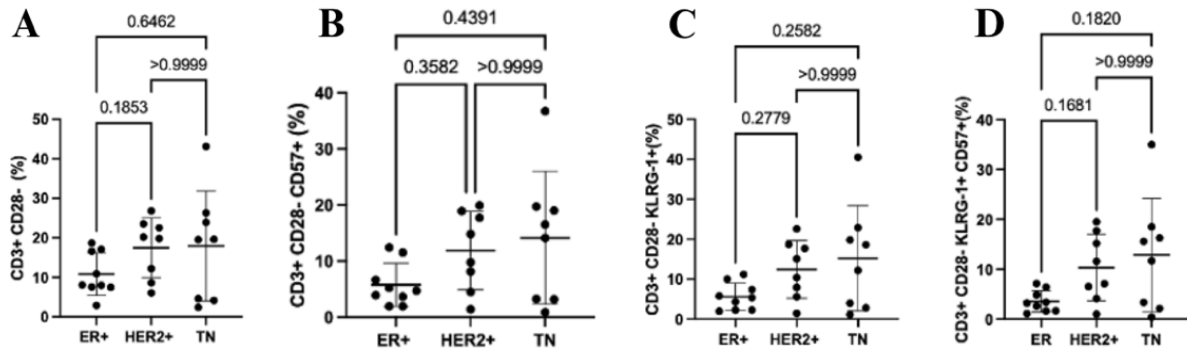


Figura 17 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD3+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline. Frequenza in termini di percentuale (%) di CD3+CD28- (A), CD3+CD28-CD57+ (B), CD3+CD28-KLRG-1+ (C), CD3+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in TNBC (n=10), HER2+ (n=8) e ER+ (n=9).

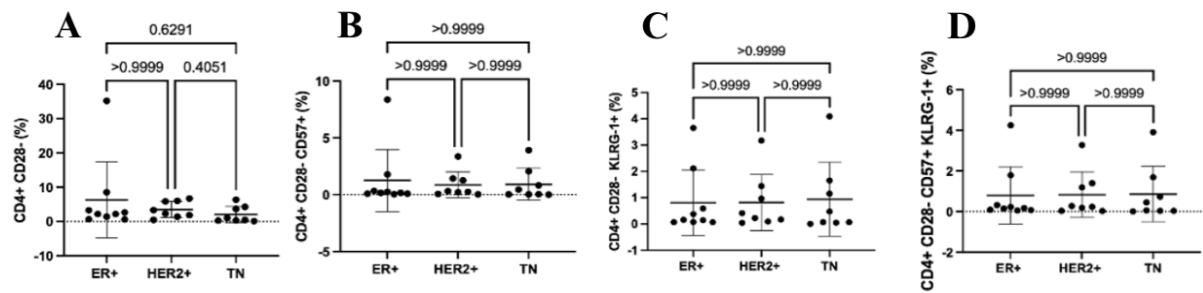


Figura 18 . Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD4+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline. Frequenza in termini di percentuale (%) di CD4+CD28- (A), CD4+CD28-CD57+ (B), CD4+CD28-KLRG-1+ (C), CD4+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in TNBC (n=10), HER2+ (n=8) e ER+ (n=9).

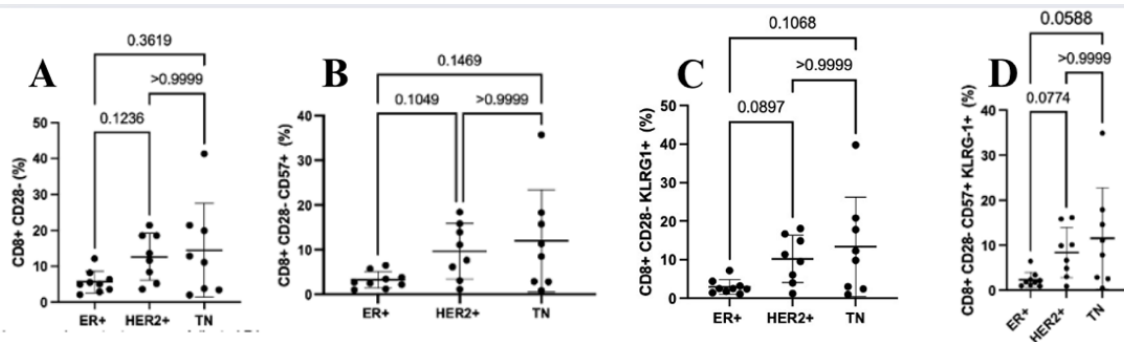


Figura 19 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD8+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline. Frequenza in termini di percentuale (%) di CD8+CD28- (A), CD8+CD28-CD57+ (B), CD8+CD28-KLRG-1+ (C), CD8+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in TNBC (n=10), HER2+ (n=8) e ER+ (n=9).

### **4.3 Confronto della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T senescenti ed esausti nei due gruppi di pazienti pCR vs RD.**

Al fine di individuare un'associazione tra la frequenza dei linfociti T circolanti in termini di percentuale (%), con fenotipo senescente ed esausto e la risposta alla terapia, abbiamo suddiviso i nostri pazienti (n=27) in due gruppi: pazienti che hanno avuto una risposta patologica completa (pCR) al termine dei cicli di terapia (gruppo A, n=16) e pazienti che presentano residuo di malattia (*Residual Disease* – RD, gruppo B, n=11). Abbiamo valutato la frequenza dei linfociti T CD3, *helper* (CD4), citotossici (CD8), e relativi marcatori di *exhaustion* (PD-1, LAG3 e TIGIT) e di senescenza (CD57+ e KLRG-1), in modo da valutare eventuali differenze le popolazioni cellulari senescenti ed esauste in seguito alla terapia Neoadiuvante nei 2 gruppi di pazienti analizzati. Nella tabella 9 (*Mann-Whitney unpaired test*) sono riportate le medie e deviazioni standard e *p-value* di tutte le sottopopolazioni di linfociti T con fenotipo senescente ed esausto analizzati per ciascuno dei due gruppi, mentre in Figura 20, 21, 22, 23, 24 e 25 sono riportati i grafici in dettaglio per ogni sottopopolazione analizzata.

L'analisi ha evidenziato che i linfociti con fenotipo esausto (CD8+CD28+TIGIT+) sono maggiormente frequenti nel gruppo di pazienti che ottengono la risposta patologica completa (pCR) rispetto a quelli con residuo di malattia (RD) (Tabella 9, Figura 22,  $2,290 \pm 0,8259$ , *Mann-Whitney unpaired test*,  $p=0,01$ ). Inoltre, si apprezza una significativa differenza nella popolazione (CD4+CD28+), dove la % di cellule T (CD4+CD28+) è maggiore nel gruppo di pazienti B ovvero gli RD (Tabella 9, Figura 21  $61,25 \pm 7,684$ , *Mann-Whitney unpaired test*,  $p=0,04$ ).

Per quanto riguarda le cellule T con fenotipo senescente non abbiamo evidenziato significative differenze tra i due gruppi di pazienti esaminati nell'analisi. (tabella 9, Figura 23, 24 e 25).

Tabella 9 Tabella riassuntiva dei valori di p value (pCR, RD), media (pCR, RD), e deviazione standard (pCR, RD) del confronto tra pCR (n=16) ed RD (n=11) Overall popolazioni linfociti esausti e senescenti.

POPOLAZIONE	PCR		RD		P-value
	MEDIAN	SD	MEDIAN	SD	
CD3+	23,25	10,93	22,30	25,59	>0,9999
CD3+ CD28+	83,31	11,77	86,20	6,176	0,6016
CD3+ CD28+ LAG3+	0,2786	0,4288	1,633	3,025	0,1983
CD3+ CD28+ PD-1+	0,3423	0,3466	0,2627	0,2816	0,6185
CD3+ CD28+ TIGIT+	8,931	2,383	6,095	4,050	0,0635
CD3+ CD28+ PD-1+ TIGIT+	0,07188	0,08019	0,05027	0,03792	0,9903
CD3+ CD28+ PD-1+ TIGIT+ LAG3+	0,03258	0,05152	0,03264	0,02929	0,6484
CD4+	64,49	9,637	68,67	9,161	0,1945
CD4+ CD28+	61,25	7,684	66,90	9,161	<b>0,0456</b>
CD4+ CD28+ LAG3+	0,02350	0,07154	0,02700	0,06341	0,7600
CD4+ CD28+ PD-1	0,3200	0,3797	0,3200	0,3119	0,8366
CD4+ CD28+ TIGIT+	7,465	2,122	4,400	2,707	0,1214
CD4+ CD28+ TIGIT+ PD-1+	0,02350	0,03551	0,02000	0,03327	0,3826
CD4+ CD28+ TIGIT+ PD-1+ LAG3+	0,006670	0,03401	0,01300	0,01209	0,2852
CD8+	30,65	9,964	23,90	8,619	0,1373
CD8+ CD28+	18,30	7,335	16,40	6,984	0,3235
CD8+ CD28+ PD-1+	0,06000	0,1734	0,08700	0,07317	0,9999
CD8+ CD28+ TIGIT+	2,290	0,8259	1,330	0,8209	<b>0,0104</b>
CD8+ CD28+LAG3 +	0,006670	0,1333	0,02700	0,1741	0,0741
CD8+ CD28+ TIGIT+ PD-1+	0,000	0,01364	0,000	0,008134	0,8126
CD8+ CD28+ TIGIT+ PD-1+ LAG3+	0,000	0,02786	0,000	0,01052	0,3345
CD3+ CD28-	15,89	11,16	13,25	6,353	0,6448
CD3+ CD28- CD57+	11,27	9,654	8,502	5,828	0,7160
CD3+ CD28- KLRG-1+	12,30	10,55	8,257	5,893	0,5118
CD3+ CD28- CD57+ KLRG-1+	9,577	9,380	6,848	5,523	0,8273
CD4+ CD28-	2,020	8,482	2,170	2,573	0,8937
CD4+ CD28- CD57+	0,1600	2,269	0,2500	0,5741	0,8366
CD4+ CD28- KLRG-1+	0,1950	1,416	0,3700	0,6383	0,9903
CD4+ CD28- KLRG-1+ CD57+	0,1265	1,501	0,2200	0,5646	0,7802
CD8+ CD28-	8,785	10,28	7,730	5,690	0,4731
CD8+ CD28- CD57+	6,335	9,272	5,750	4,808	0,6102
CD8+ CD28- KLRG-1	5,865	10,31	4,390	5,564	0,7432
CD8+ CD28- KLRG-1+ CD57+	4,895	9,142	3,370	4,503	0,6800

## Popolazioni esauste

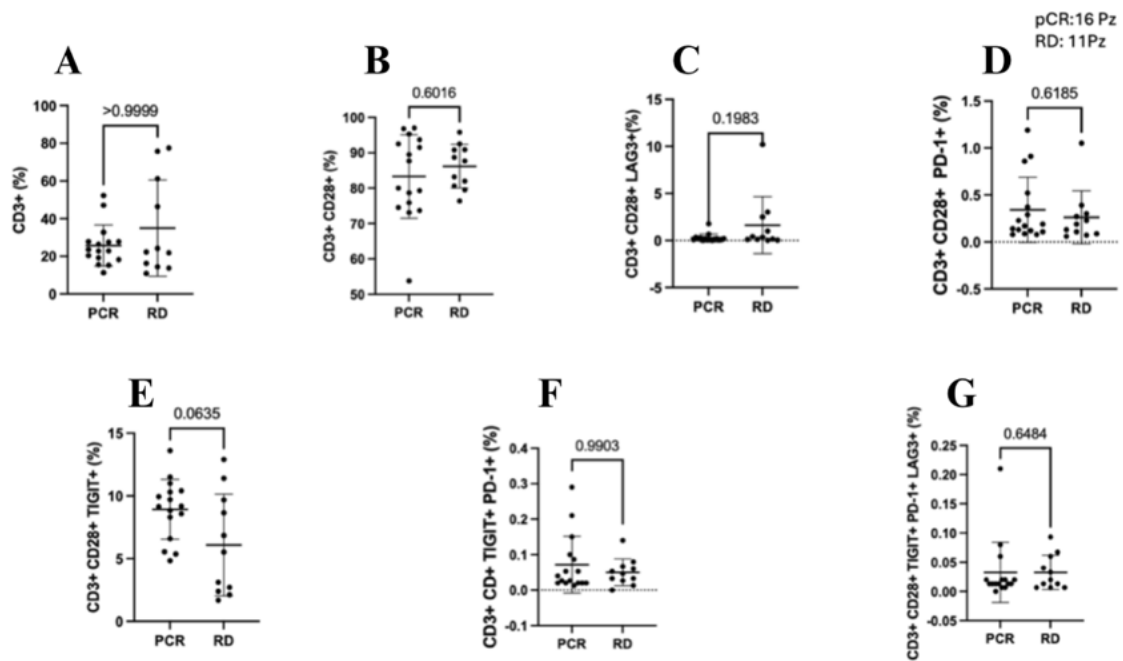


Figura 20 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD3+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline in base alla risposta alla terapia (PRC vs. RD). Frequenza in termini di percentuale (%) CD3+ (A), CD3+CD28+ (B), CD3+CD28+LAG3+ (C), CD3+CD28+PD1+ (D), CD3+CD28+TIGIT+ (E), CD3+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD3+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in pCR (n=16) ed RD (n=11).

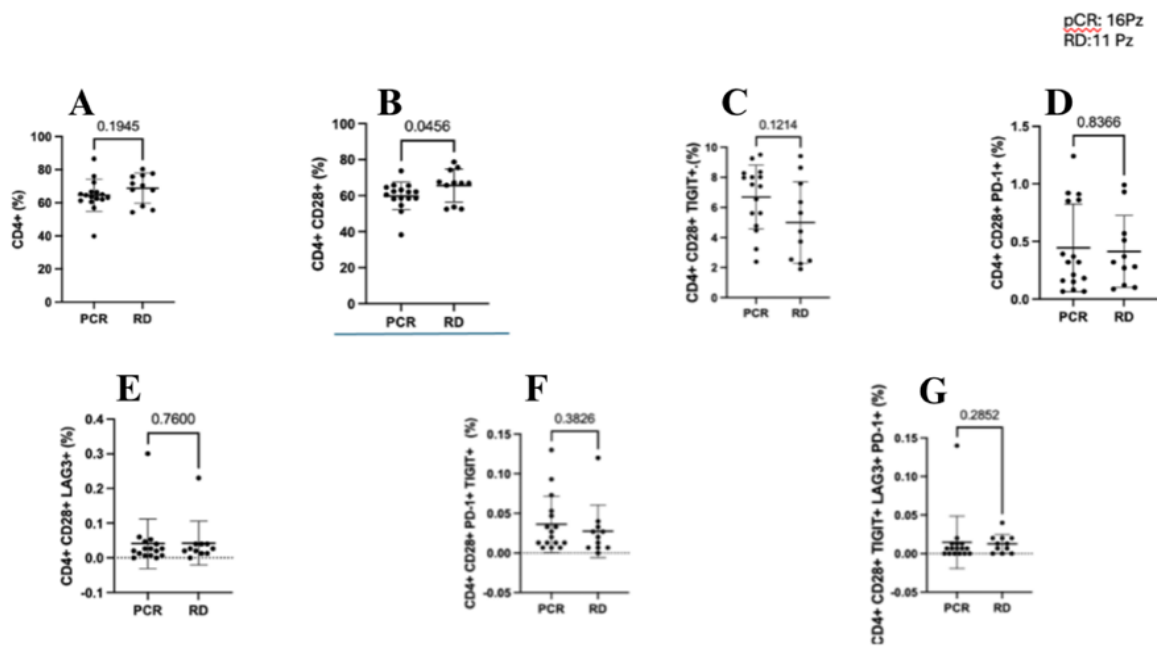


Figura 21 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD4+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline in base alla risposta alla terapia (PRC vs. RD). Frequenza in termini di percentuale (%) CD3+ (A), CD3+CD28+ (B), CD4+CD28+LAG3+ (C), CD4+CD28+PD1+ (D), CD4+CD28+TIGIT+ (E), CD4+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD4+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in pCR (n=16) ed RD (n=11).



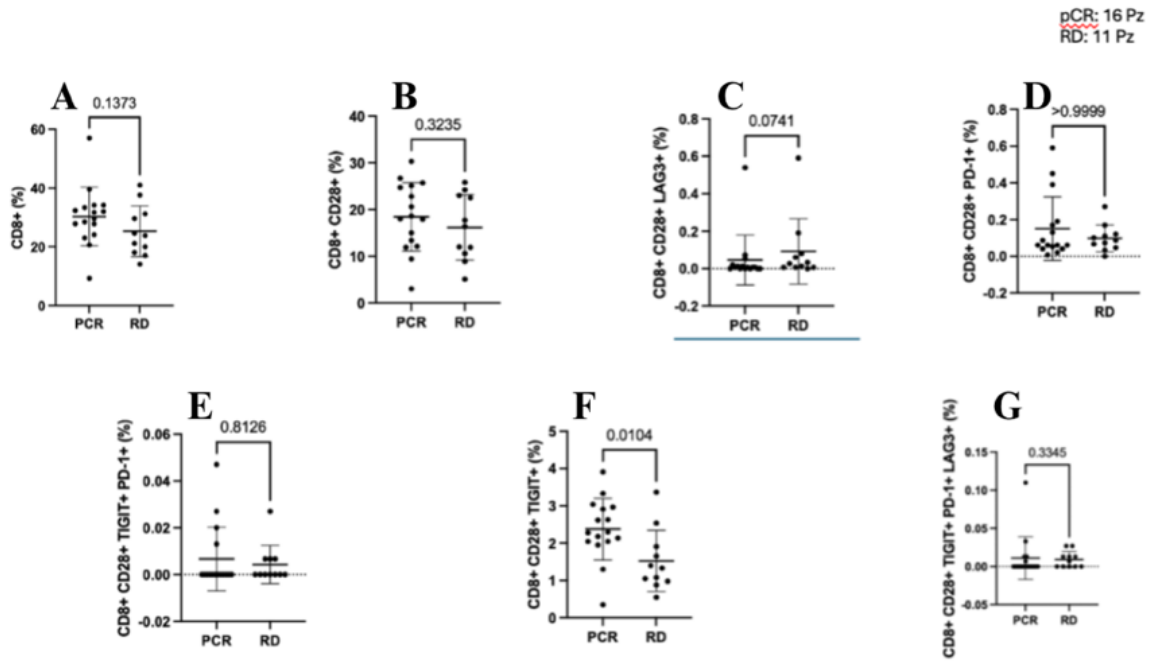


Figura 22 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD8+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline in base alla risposta alla terapia (PRC vs. RD). Frequenza in termini di percentuale (%) CD8+ (A), CD8+CD28+ (B), CD8+CD28+LAG3+ (C), CD8+CD28+PD1+ (D), CD8+CD28+TIGIT+ (E), CD8+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD8+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in pCR (n=16) ed RD (n=11)

## Popolazioni senescenti

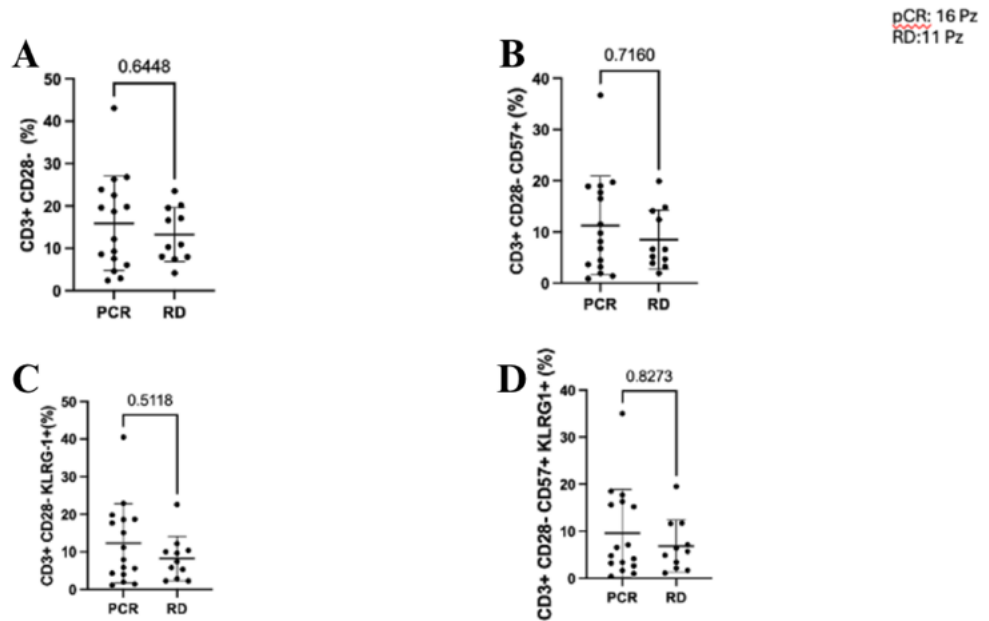


Figura 23 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD3+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline in base alla risposta alla terapia (PRC vs. RD). Frequenza in termini di percentuale (%) di CD3+CD28- (A), CD3+CD28-CD57+ (B), CD3+CD28-KLRG-1+ (C), CD3+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in pCR (n=16) ed RD (n=11).

pCR: 16 Pz  
RD: 11 Pz

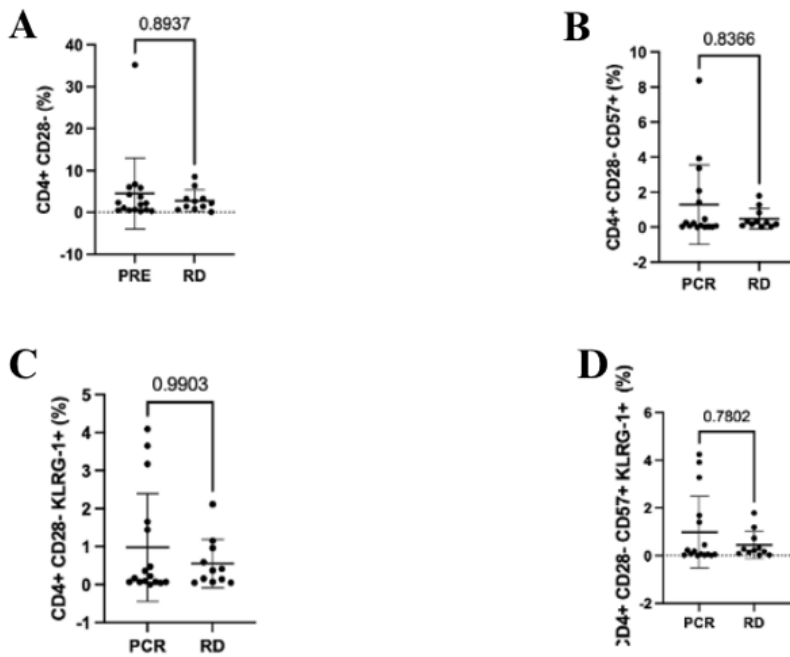


Figura 24 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD4+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline in base alla risposta radiologica (PRC vs. RD). Frequenza in termini di percentuale (%) di CD4+CD28- (A), CD4+CD28-CD57+ (B), CD4+CD28-KLRG-1+ (C), CD4+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in pCR (n=16) ed RD (n=11).

pCR: 16 Pz  
RD: 11 Pz

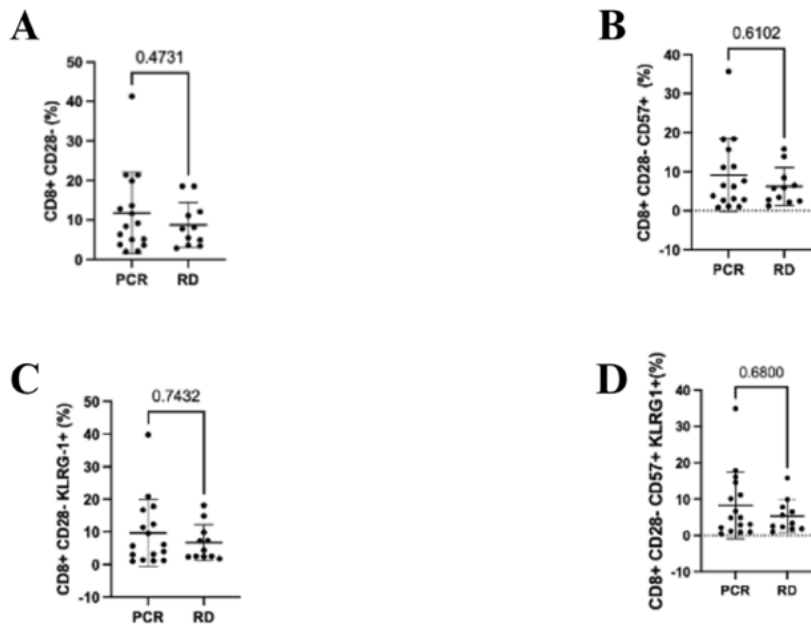


Figura 25 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD8+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline in base alla risposta radiologica (PRC vs. RD). Frequenza in termini di percentuale (%) di CD8+CD28- (A), CD8+CD28-CD57+ (B), CD8+CD28-KLRG-1+ (C), CD8+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in pCR (n=16) ed RD (n=11).

Per un ulteriore approfondimento dell'analisi precedente è stato fatto un confronto della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T con fenotipo senescente ed esausto per verificare la correlazione che prevede che all' aumentare di una corrisponde la diminuzione dell'altra nei due gruppi di pazienti: pazienti che hanno avuto una risposta patologica completa (pCR) al termine dei cicli di terapia (gruppo A, n=16) e pazienti che presentano residuo di malattia (*Residual Disease* – RD, gruppo B, n=11). Abbiamo preso in esame confrontando le cellule dei linfociti T di maggiore interesse ottenuti precedentemente facendo le seguenti analisi:

- CD4+ VS CD8
- CD4+CD28+ VS CD4+CD28-
- CD4+CD28+TIGIT+ VS CD4+CD28-CD57+KLRG1+
- CD4+CD28+LAG3+ VS CD4+CD28-CD57+KLRG1+
- CD4+CD28+PD1+ VS CD4+CD28-CD57+KLRG1+
- CD4+CD28+TIGIT+LAG3+PD1+ VS CD4+CD28-CD57+KLRG1+
- CD8+CD28+ VS CD8+CD28-
- CD8+CD28+TIGIT+ VS CD8+CD28-CD57+KLRG1+
- CD8+CD28+LAG3+ VS CD8+CD28-CD57+KLRG1+
- CD8+CD28+PD1+ VS CD8+CD28-CD57+KLRG1+
- CD8+CD28+TIGIT+LAG3+PD1+ VS CD8+CD28-CD57+KLRG1+

Nella tabella 10 (*Pearson r- test*) sono riportate R, gli intervalli di confidenza al 95% e i *p-value* di tutte le sottopopolazioni di linfociti T con fenotipo senescente ed esausto analizzati per ciascuno dei due gruppi A e B, mentre in Figura 26 e 27 sono riportati i grafici in dettaglio per ogni sottopopolazione analizzata.

Dall'analisi è emerso che entrambi i gruppi A e B di pazienti riportano delle significatività nel confronto di cellule CD4+ VS CD8+, con una correlazione di aumento delle cellule CD8+ con la conseguente diminuzione delle cellule CD4+ (Tabella 10, Figura 26, -0,9905 a -0,9191,  $p = -0,001$ ) (Tabella 10, Figura 27, -0,9863 a 0,8018,  $p = <0,001$ ).

Mentre non sono emerse significatività dalle correlazioni delle cellule con fenotipo esausto e senescente nelle differenti popolazioni di linfociti T, il che indica che non c'è una correlazione tra i 2 fenotipi. (Tabella 10, figura 26 e 27).

Tabella 10 Tabella riassuntiva dei valori di p value (pCR, RD), intervallo di confidenza al 95% (pCR, RD), ed R (pCR, RD) del confronto tra popolazioni senescenti ed esausti in pazienti pCR (n=16) ed RD (n=11).

POPOLAZIONE	R	INTERVALLO di CONFIDENZA 95%	P VALUE
CD8 VS CD4 pCR	-0,9720	-0,9905 a -0,9191	-0,0001
CD4+ CD28+ VS CD4+ CD28-	-0,2838	-0,6834 a 0,2466	0,2867
CD8+ CD28+ VS CD8+ CD28-	-0,4559	-0,7762 a 0,05143	0,0759
CD4+ CD28+ TIGIT+ VS CD4+ CD28- CD57+ KLRG-1+	0,006377	-0,4909 a 0,005	0,9813
CD4+ CD28+ LAG3+ VS CD4+ CD28- CD57+ KLRG-1+	0,1307	-0,3903 a 0,5893	0,6295
CD4+ CD28+ PD-1+ VS CD4+ CD28- CD57+ KLRG-1+	-0,3451	-0,7180 a 0,1817	0,1905
CD4+ CD28+ TIGIT+ LAG3+ PD-1+ VS CD4+ CD28- CD57+ KLRG-1	-0,2241	-0,6478 a 0,3056	0,4041
CD8+ CD28+ TIGIT+ VS CD8+ CD28- CD57+ KLRG-1+	0,1045	-0,4126 a 0,5707	0,7001
CD8+ CD28+ LAG3+ VS CD8+ CD28- CD57+ KLRG-1+	-0,1069	-0,5723 a 0,4106	0,6936
CD8+ CD28+ PD-1+ VS CD8+ CD28- CD57+ KLRG-1+	-0,2351	-0,6545 a 0,2950	0,3807
CD8+ CD28+ TIGIT+ LAG3+ PD-1+ VS CD8+ CD28- CD57+ KLRG-1+	-0,01219	-0,5048 a 0,4865	0,9643
CD4+ VS CD8+ RD	-0,9464	-0,9863 a 0,8018	< 0,0001
CD4+ CD28+ VS CD4+ CD28-	-0,1245	-0,6740 a 0,5138	0,7154
CD8+ CD28+ VS CD8+ CD28-	0,001207	-0,5991 a 0,6006	0,9972
CD4+ CD28+ TIGIT+ VS CD4+ CD28- CD57+ KLRG-1+	-0,4438	-0,8242 a 0,2127	0,1715
CD4+ CD28+ LAG3+ VS CD4+ CD28- CD57+ KLRG-1+	-0,02970	-0,6186 a 0,5805	0,9309
CD4+ CD28+ PD-1+ VS CD4+ CD28- CD57+ KLRG-1+	-0,05097	-0,6315 a 0,5662	0,8817
CD4+ CD28+ TIGIT+ LAG3+ PD-1+ VS CD4+ CD28- CD57+ KLRG-1	0,2920	-0,3733 a 0,7589	0,3836
CD8+ CD28+ TIGIT+ VS CD8+ CD28- CD57+ KLRG-1+	0,02151	-0,5859 a 0,6135	0,9499
CD8+ CD28+ LAG3+ VS CD8+ CD28- CD57+ KLRG-1+	-0,2847	-0,7555 a 0,3801	0,3961
CD8+ CD28+ PD-1+ VS CD8+ CD28- CD57+ KLRG-1+	-0,5867	-0,8777 a 0,0239	0,0578
CD8+ CD28+ TIGIT+ LAG3+ PD-1+ VS CD8+ CD28- CD57+ KLRG-1+	-0,1919	-0,7100 a 0,4611	0,5720

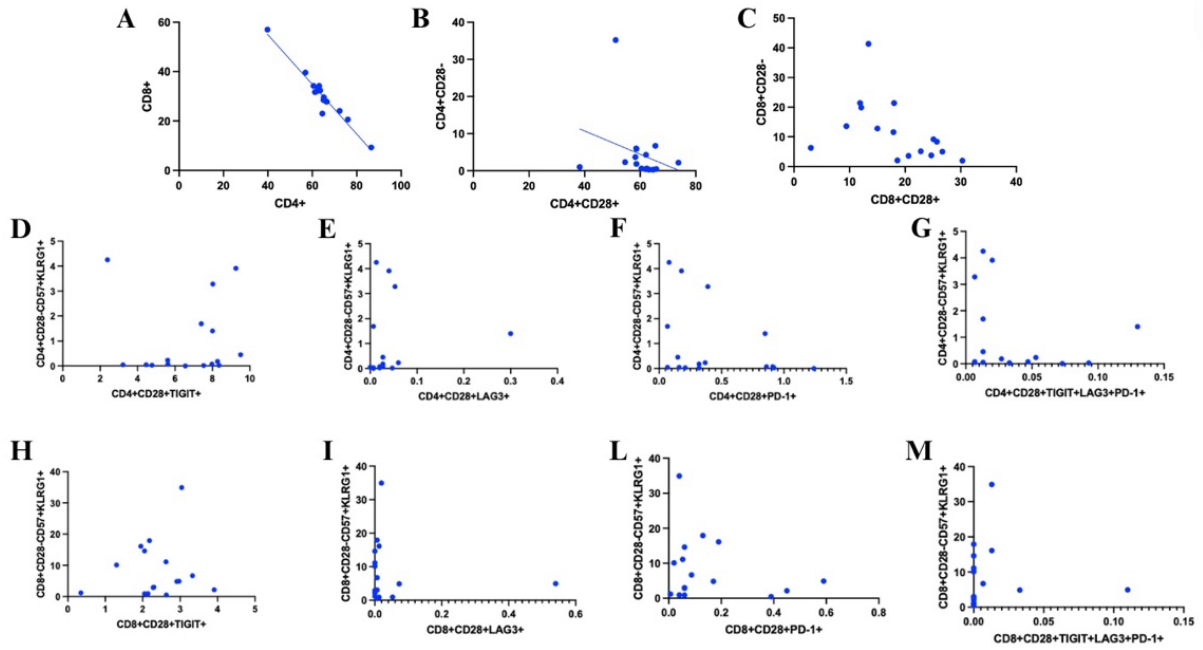


Figura 26 Grafici che rappresentano il confronto tra le popolazioni con fenotipo senescente ed esausto CD8+ Vs CD4+ (A), CD4+ CD28- VS CD4+ CD28+ (B), CD8+ CD28- VS CD8+ CD28+ (C), CD4+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD4+ CD28+ TIGIT+ (D), CD4+ CD28- CD57+ KLRG1+ VS CD4+ CD28+ LAG3+ (E), CD4+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD4+ CD28+ PD-1+ (F), CD4+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD4+ CD28+ TIGIT+ LAG3+ PD-1+ (G), CD8+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD8+ CD28+ TIGIT+ (H), CD8+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD8+ CD28+ TIGIT+, CD8+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD8+ CD28+ LAG3+(I), CD8+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD8+ CD28+ PD-1+ (L), CD8+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD8+ CD28+ TIGIT+ LAG3+ PD-1+ (M) nei pazienti liberi pCR (n=16)

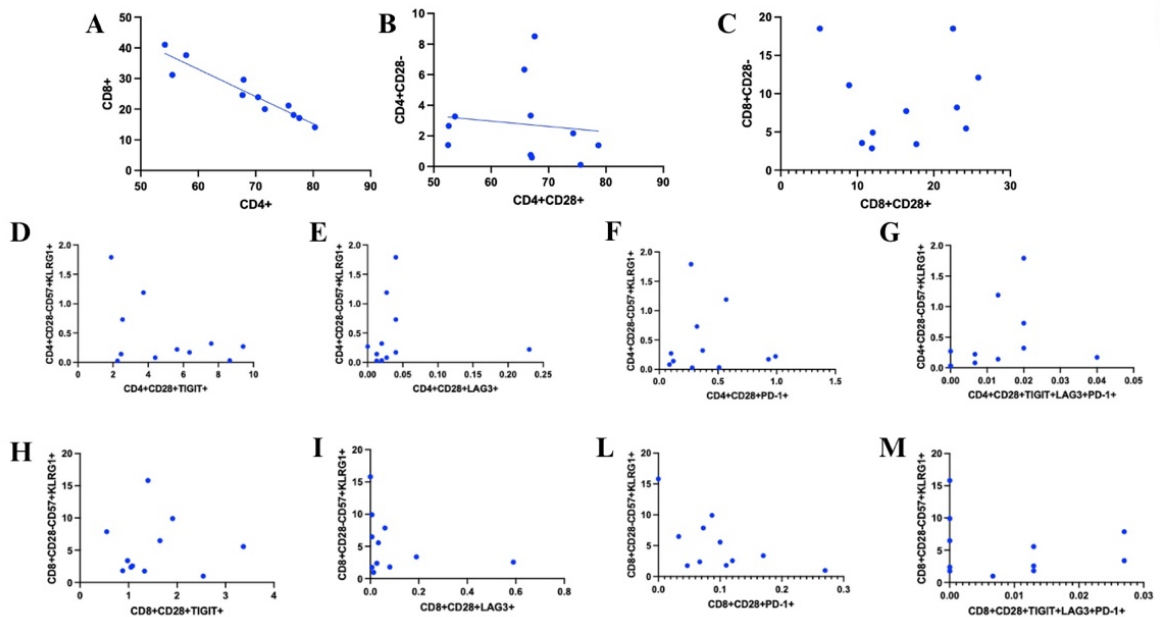


Figura 27 Grafici che rappresentano il confronto tra le popolazioni con fenotipo senescente ed esausto CD8+ Vs CD4+ (A), CD4+ CD28- VS CD4+ CD28+ (B), CD8+ CD28- VS CD8+ CD28+ (C), CD4+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD4+ CD28+ TIGIT+ (D), CD4+ CD28- CD57+ KLRG1+ VS CD4+ CD28+ LAG3+ (E), CD4+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD4+ CD28+ PD-1+ (F), CD4+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD4+ CD28+ TIGIT+ LAG3+ PD-1+ (G), CD8+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD8+ CD28+ TIGIT+ (H), CD8+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD8+ CD28+ TIGIT+, CD8+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD8+ CD28+ LAG3+(I), CD8+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD8+ CD28+ PD-1+ (L), CD8+ CD28- KLRG1+ CD57+ VS CD8+ CD28+ TIGIT+ LAG3+ PD-1+ (M) nei pazienti RD (n=11).

#### **4.4 Valutazione della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T senescenti ed esausti prima e dopo la terapia**

Al fine di caratterizzare i linfociti T con fenotipo senescente ed esausto prima e dopo la terapia e valutare eventuali correlazioni al fine prognostico, mediante la tecnica di citometria a flusso abbiamo analizzato la frequenza dei linfociti T senescenti ed esausti (in termini di percentuale) (%) sia prima dell'inizio della terapia (*baseline*) sia dopo la terapia (POST) in 25 pazienti.

Abbiamo valutato la frequenza dei linfociti T CD3, *helper* (CD4), citotossici (CD8), e relativi marcatori di *exhaustion* (PD-1, LAG3 e TIGIT) e di senescenza (CD57+ e KLRG-1), in modo da valutare eventuali differenze le popolazioni cellulari con fenotipo senescente ed esausto prima e dopo il trattamento con la chemioterapia Neoadiuvante.

Nella tabella (11, *Wicolxon- Paired Test*), sono riportate le medie, le deviazioni standard e p value di tutte le sottopopolazioni di linfociti T con fenotipo senescente ed esausto analizzate per i due gruppi, mentre in Figura 28,29,30,31,32 e 33, sono riportati i grafici in dettaglio per ogni sottopopolazione analizzata.

I dati dimostrano che i linfociti T citotossici con fenotipo esausto (CD8+ CD28+ TIGIT+ PD1+) (CD8+ CD28+ TIGIT+ PD1+ LAG3+) (Tabella 11, Figura 30,  $0,000\pm 0,02865$ ,  $0,02700\pm 0,1023$  *Wicolxon- Paired Test*;  $P=0,0030$ ,  $P=0,0003$ ) hanno una significativa maggior frequenza al POST rispetto al baseline.

Dai dati si può anche notare una significativa maggior frequenza al POST dei linfociti T con fenotipo senescente (CD3+CD28-) (CD3+ CD28- KLRG1+) (CD3+ CD28- CD57+) (CD3+ CD28- CD57+ KLRG1+) (Tabella 11, Figura 31;  $28,80\pm 18,03$ ,  $19,60\pm 14,60$ ,  $19,80\pm 15,92$ ,  $10,50\pm 14,45$ ; *Wicolxon- Paired Test*;  $P=0,0003$ ,  $0,0005$ ,  $0,0008$ ,  $0,0005$ ) e linfociti T citotossici (CD8+ CD28-) (CD8+ CD28- CD57+) (CD8+ CD28- KLRG1+) (Tabella 11, Figura 33;  $20,80\pm 13,75$ ,  $8,350\pm 11,64$ ,  $12,30\pm 13,24$  *Wicolxon- Paired Test*;  $P=0,0031$ ;  $0,0296$ ;  $0,0626$ ), che potrebbe essere un indice prognostico riguardo alle popolazioni senescenti ed esauste per il tumore al seno.

Tabella 11 Tabella riassuntiva dei valori di p value (PRE, POST), media (PRE, POST), e deviazione standard (PRE, POST) del confronto tra PRE (n=25) ed POST (n=25) Overall in popolazioni linfociti esausti e senescenti.

POPOLAZIONE	PRE		POST		P value
	MEDIAN	SD	MEDIAN	SD	
CD3+	22,90	19,05	36,30	23,01	<b>0,0145</b>
CD3+ CD28+	83,20	10,16	66,50	18,53	0,0002
CD3+ CD28+ LAG3+	0,1900	2,098	0,09300	0,3067	0,5602
CD3+ CD28+ PD-1+	0,1700	0,3308	0,2800	0,4199	0,3354
CD3+ CD28+ TIGIT+	8,580	3,305	3,570	2,437	<b>0,0015</b>
CD3+ CD28+ PD-1+ TIGIT+	0,04000	0,06843	0,06700	0,2670	0,1215
CD3+ CD28+ PD-1+ TIGIT+ LAG3+	0,01300	0,04424	0,02700	0,1848	0,0965
CD4+	65,20	9,863	52,60	11,30	<b>0,0001</b>
CD4+ CD28+	62,10	8,933	48,40	10,82	<b>0,0001</b>
CD4+ CD28+ LAG3+	0,02700	0,06960	0,01300	0,05538	0,9000
CD4+ CD28+ PD-1	0,3200	0,3472	0,4300	0,2459	0,8325
CD4+ CD28+ TIGIT+	6,350	2,518	2,520	1,765	<b>0,0001</b>
CD4+ CD28+ TIGIT+ PD-1+	0,02000	0,03522	0,06000	0,1471	<b>0,0017</b>
CD4+ CD28+ TIGIT+ PD-1+ LAG3+	0,006670	0,02787	0,000	0,02865	0,9796
CD8+	28,50	9,891	36,30	11,03	<b>0,0001</b>
CD8+ CD28+ PD-1+	0,06700	0,1472	0,09300	0,1016	0,6385
CD8+ CD28+ TIGIT+	2,050	0,8885	1,550	1,022	0,2175
CD8+ CD28- LAG3 +	0,006670	0,1558	0,05300	0,1312	0,0798
CD8+ CD28+ TIGIT+ PD-1+	0,000	0,01191	0,02700	0,1023	<b>0,0003</b>
CD8+ CD28+ TIGIT+ PD-1+ LAG3+	0,000	0,02256	0,01300	0,05450	<b>0,0030</b>
CD3+ CD28-	16,60	9,707	28,80	18,03	<b>0,0003</b>
CD3+ CD28- CD57+	8,150	8,568	19,60	14,60	<b>0,0005</b>
CD3+ CD28- KLRG-1+	7,920	9,350	19,80	15,92	<b>0,0008</b>
CD3+ CD28- CD57+ KLRG-1+	6,430	8,293	10,50	14,45	<b>0,0005</b>
CD4+ CD28-	2,190	6,903	2,080	5,406	0,7510
CD4+ CD28- CD57+	0,2500	1,859	0,2600	3,804	0,0951
CD4+ CD28- KLRG-1+	0,2200	1,199	0,4300	3,324	0,0839
CD4+ CD28- KLRG-1+ CD57+	0,2200	1,254	0,2100	3,049	0,5838
CD8+ CD28-	8,190	9,029	20,80	13,75	<b>0,0031</b>
CD8+ CD28- CD57+	5,750	8,087	8,350	11,64	<b>0,0296</b>
CD8+ CD28- KLRG-1	4,390	9,019	12,30	13,24	0,0626
CD8+ CD28- KLRG-1+ CD57+	3,370	7,923	6,690	11,46	<b>0,0079</b>

## Popolazioni esauste

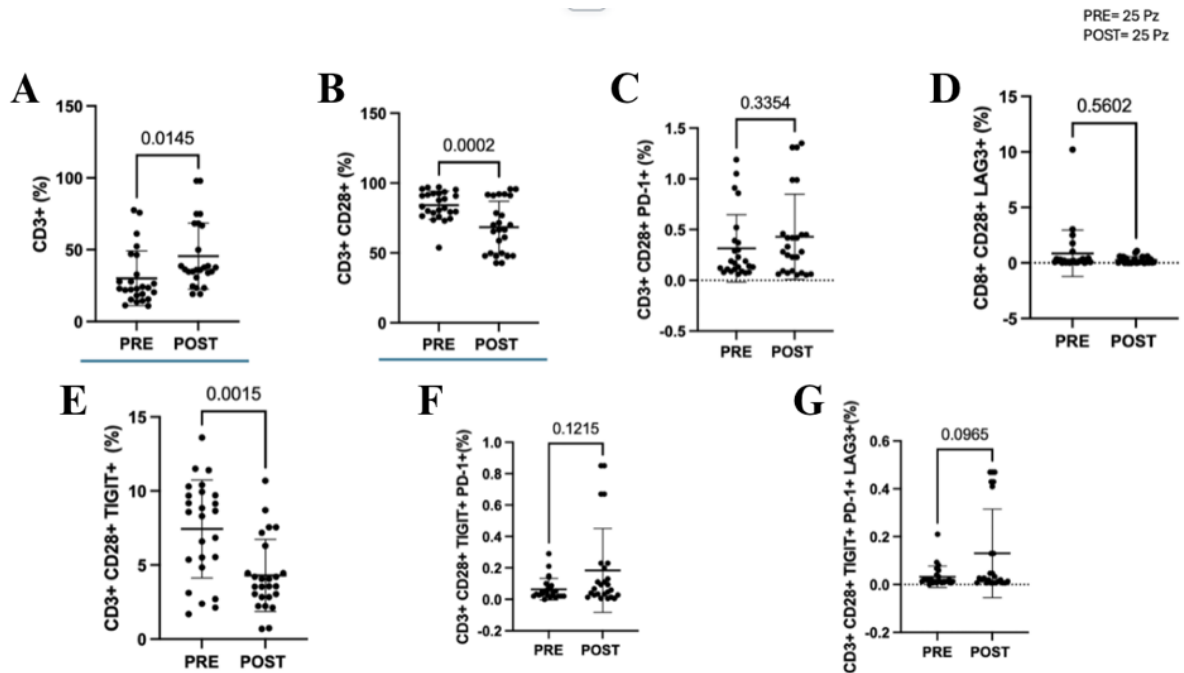


Figura 28 . Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD3+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) CD3+ (A), CD3+CD28+ (B), CD3+CD28+LAG3+ (C), CD3+CD28+PD1+ (D), CD3+CD28+TIGIT+ (E), CD3+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD3+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in PRE (n=25) e POST (n=25).

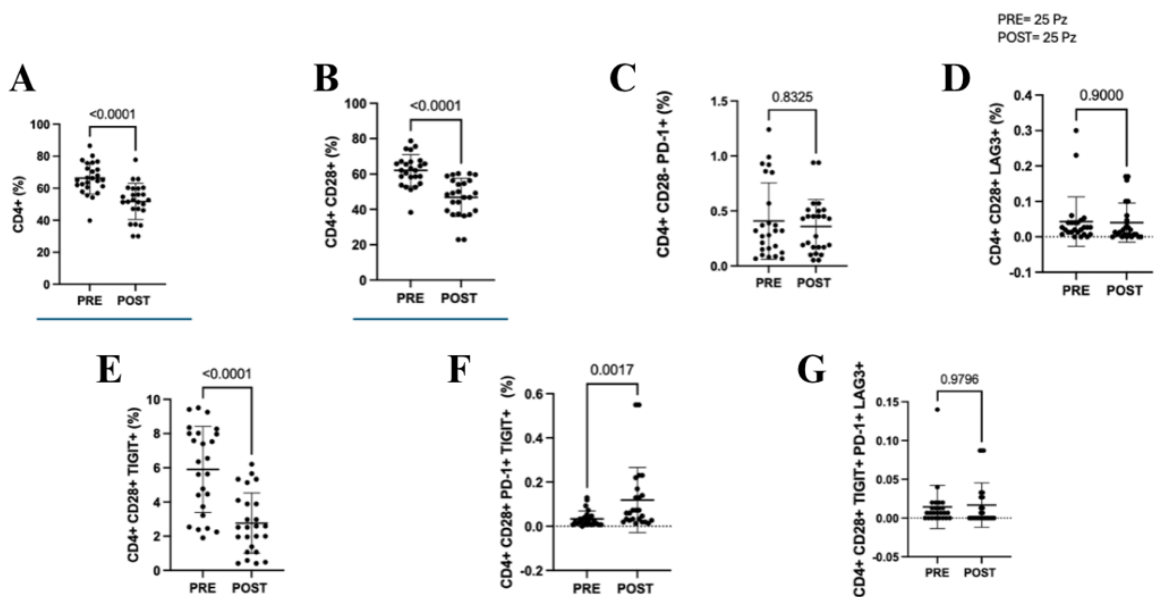


Figura 29 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD4+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) CD4+ (A), CD4+CD28+ (B), CD4+CD28+LAG3+ (C), CD4+CD28+PD1+ (D), CD4+CD28+TIGIT+ (E), CD4+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD4+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in PRE (n=25) e POST (n=25).



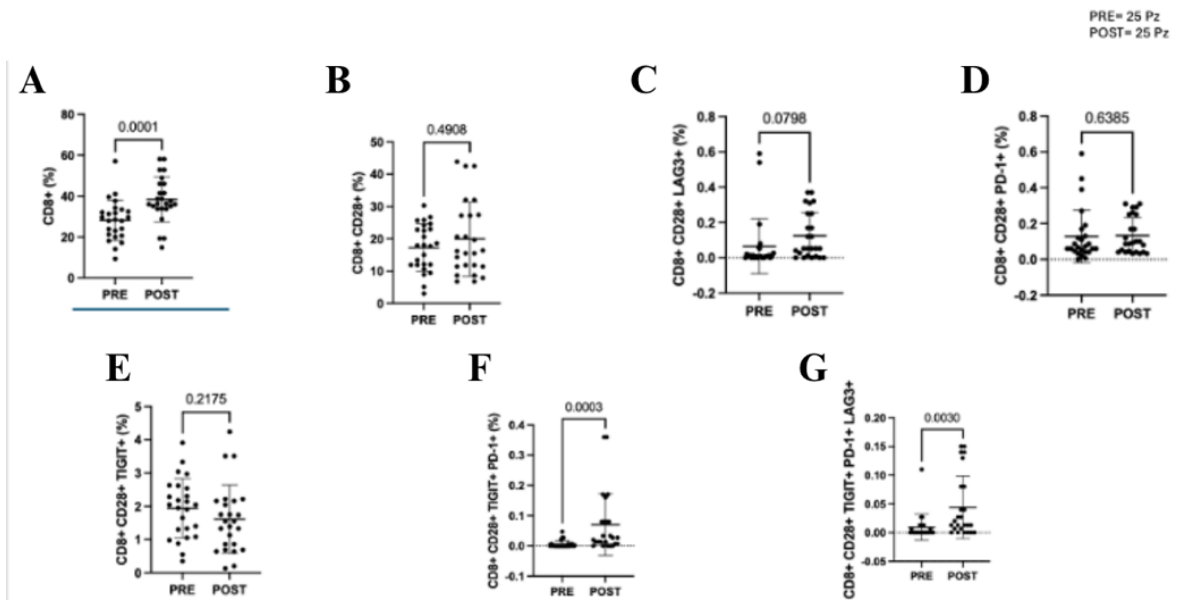


Figura 30 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD8+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) CD8+ (A), CD8+CD28+ (B), CD8+CD28+LAG3+ (C), CD8+CD28+PD1+ (D), CD8+CD28+TIGIT+ (E), CD8+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD8+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in PRE (n=25) e POST (n=25).

## Popolazioni Senescenti

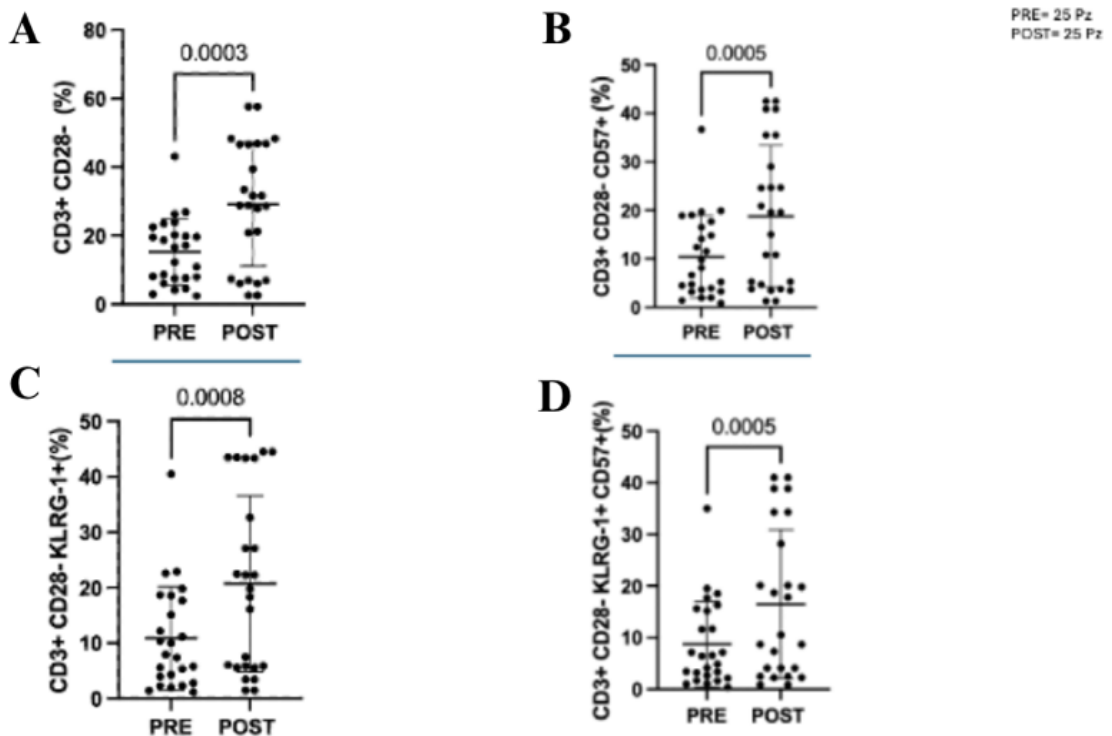


Figura 31 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD3+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) di CD3+CD28- (A), CD3+CD28-CD57+ (B), CD3+CD28-KLRG-1+ (C), CD3+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in PRE (n=25) e POST (n=25).

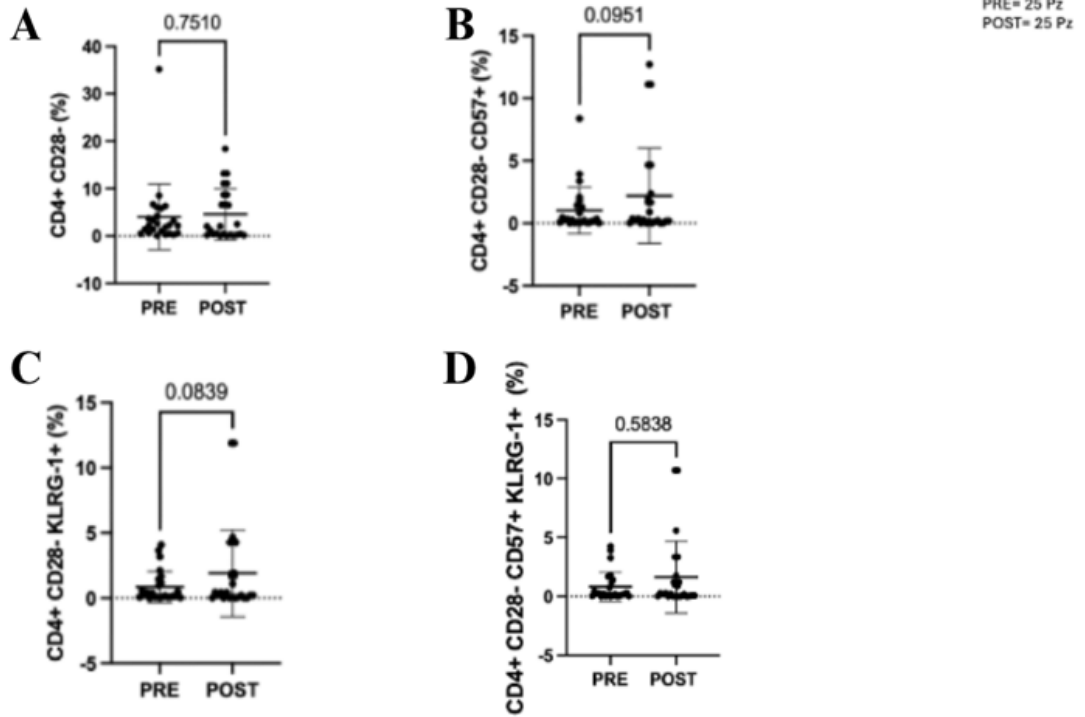


Figura 32 U Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD4+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) di CD4+CD28- (A), CD4+CD28-CD57+ (B), CD4+CD28-KLRG-1+ (C), CD4+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in PRE (n=25) e POST (n=25).

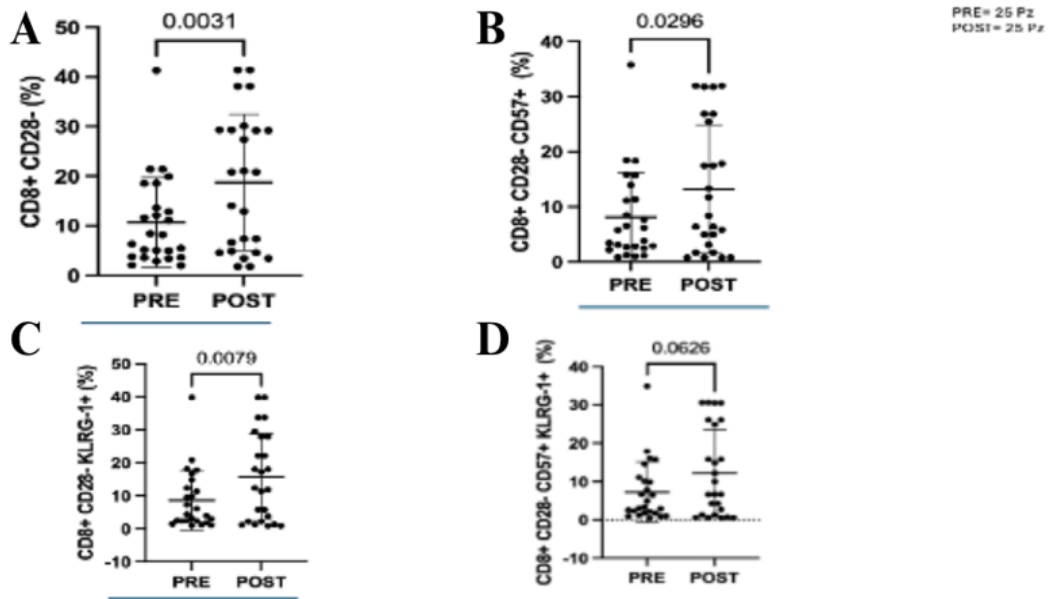


Figura 33 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD8+ analizzate nei tre sottotipi molecolari di tumore al seno al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) di CD8+CD28- (A), CD8+CD28-CD57+ (B), CD8+CD28-KLRG-1+ (C), CD8+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in PRE (n=25) e POST (n=25)

Per un'indagine più accurata dell'analisi svolta precedentemente, abbiamo stratificato i pazienti in base al fenotipo molecolare del tumore al seno, gruppo A, TNBC (n=8), gruppo B HER2+ (n=8) e gruppo C ER+ (n=9).

L'analisi è stata svolta al fine di ricercare delle differenze significative in termini di percentuale (%) tra i differenti fenotipi molecolari del tumore dei pazienti nell'ambito dei linfociti T con fenotipo senescente ed esausto prima e dopo la terapia.

.Tabella 12 Tabella riassuntiva dei valori di p value (PRE, POST), media (PRE, POST), e deviazione standard (PRE, POST) del confronto tra PRE ed POST in popolazioni linfociti esausti e senescenti di pazienti HER2+ (n=8).

POPOLAZIONE	PRE		POST		P VALUE
	MEDIAN	SD	MEDIAN	SD	
CD3+	22,85	5,525	32,75	18,56	0,0547
CD3+ CD28+	79,10	7,960	70,10	17,24	0,1094
CD3+ CD28+ LAG3+	0,1950	0,5711	0,05650	0,2357	0,7422
CD3+ CD28+ PD-1+	0,1800	0,2732	0,2650	0,4134	0,7422
CD3+ CD28+ TIGIT+	9,015	2,696	2,890	1,240	0,0078
CD3+ CD28+ PD-1+ TIGIT+	0,04650	0,08953	0,03650	0,2881	0,9297
CD3+ CD28+ PD-1+ TIGIT+ LAG3+	0,02000	0,06762	0,006670	0,1481	0,9453
CD4+	64,85	6,270	51,95	4,258	<b>0,0078</b>
CD4+ CD28+	58,70	5,372	48,00	7,833	<b>0,0078</b>
CD4+ CD28+ LAG3+	0,03700	0,09727	0,006670	0,05782	0,2656
CD4+ CD28+ PD-1	0,3450	0,2301	0,1700	0,2992	0,4609
CD4+ CD28+ TIGIT+	7,765	1,974	1,695	1,122	<b>0,0078</b>
CD4+ CD28+ TIGIT+ PD-1+	0,03000	0,04044	0,03300	0,1813	0,3672
CD4+ CD28+ TIGIT+ PD-1+ LAG3+	0,009835	0,04700	0,000	0,03076	0,1875
CD8+	28,75	7,122	37,50	5,018	0,1094
CD8+ CD28+	19,30	7,054	15,50	11,25	0,9453
CD8+ CD28+ PD-1+	0,07350	0,1917	0,1315	0,1113	0,6172
CD8+ CD28+ TIGIT+	2,000	0,7051	1,230	0,9887	0,2500
CD8+ CD28- LAG3 +	0,006670	0,1887	0,09150	0,1467	0,5469
CD8+ CD28+ TIGIT+ PD-1+	0,000	0,01794	0,02300	0,06010	0,1875
CD8+ CD28+ TIGIT+ PD-1+ LAG3+	0,000	0,03819	0,02334	0,05213	0,4531
CD3+ CD28-	20,00	7,541	28,80	16,04	0,1484
CD3+ CD28- CD57+	12,30	6,956	22,15	14,80	0,0781
CD3+ CD28- KLRG-1+	12,75	7,265	20,30	15,01	0,1484
CD3+ CD28- CD57+ KLRG-1+	9,365	6,689	18,95	14,85	0,0781
CD4+ CD28-	2,825	2,382	2,080	5,588	0,7422
CD4+ CD28- CD57+	0,2850	1,145	1,670	4,738	0,0781
CD4+ CD28- KLRG-1+	0,3150	1,070	1,690	5,116	<b>0,0547</b>
CD4+ CD28- KLRG-1+ CD57+	0,2500	1,124	1,090	4,696	0,3125
CD8+ CD28-	12,60	6,582	20,80	10,03	0,2500
CD8+ CD28- CD57+	9,375	6,166	14,55	9,417	0,2500
CD8+ CD28- KLRG-1	10,49	6,152	14,95	9,427	0,1484
CD8+ CD28- KLRG-1+ CD57+	8,290	5,601	8,100	9,422	0,2500

## Popolazioni esauste HER2+

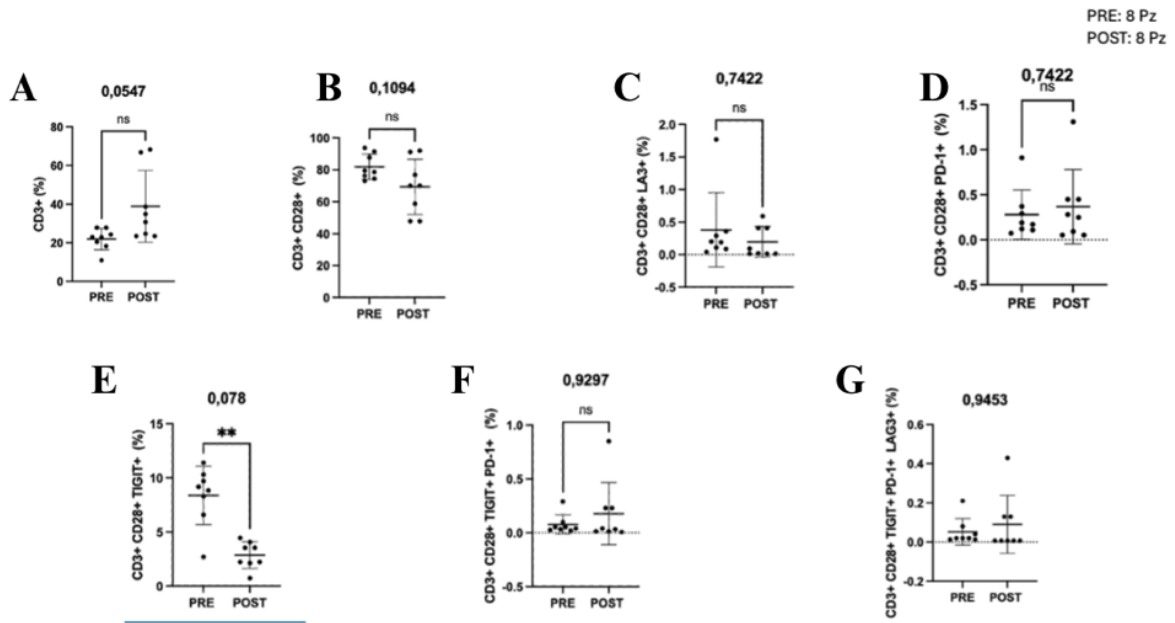


Figura 34 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD3+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno HER2+ al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) CD3+ (A), CD3+CD28+ (B), CD3+CD28+LAG3+ (C), CD3+CD28+PD1+ (D), CD3+CD28+TIGIT+ (E), CD3+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD3+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in PRE e POST di pazienti HER2+ (n=8).

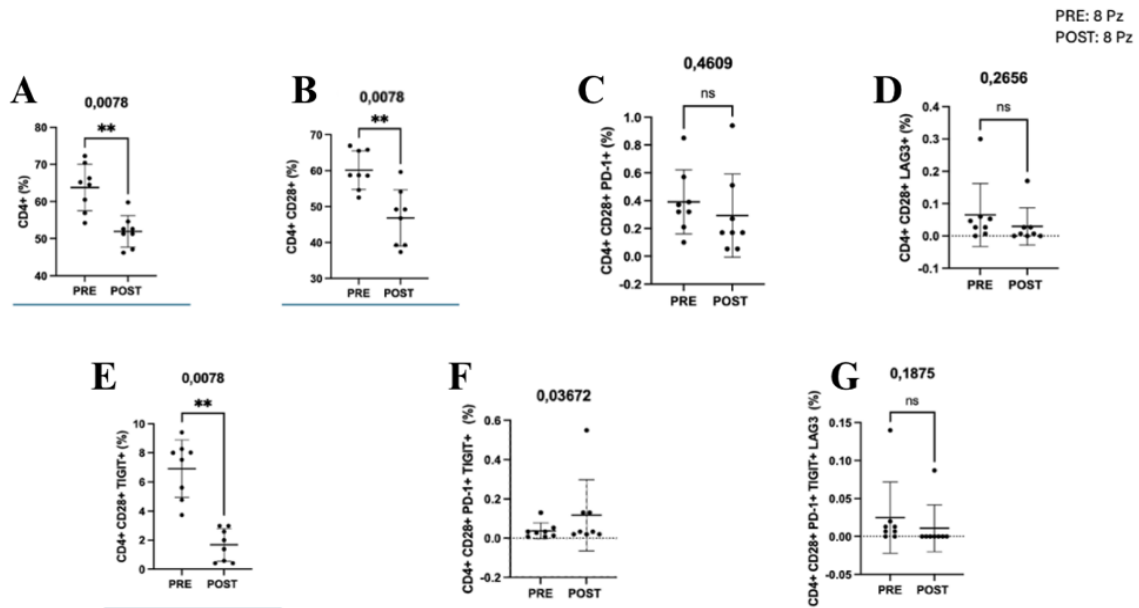


Figura 35 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD4+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno HER2+ al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) CD4+ (A), CD4+CD28+ (B), CD4+CD28+LAG3+ (C), CD4+CD28+PD1+ (D), CD4+CD28+TIGIT+ (E), CD4+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD4+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in PRE e POST di pazienti HER2+ (n=8).

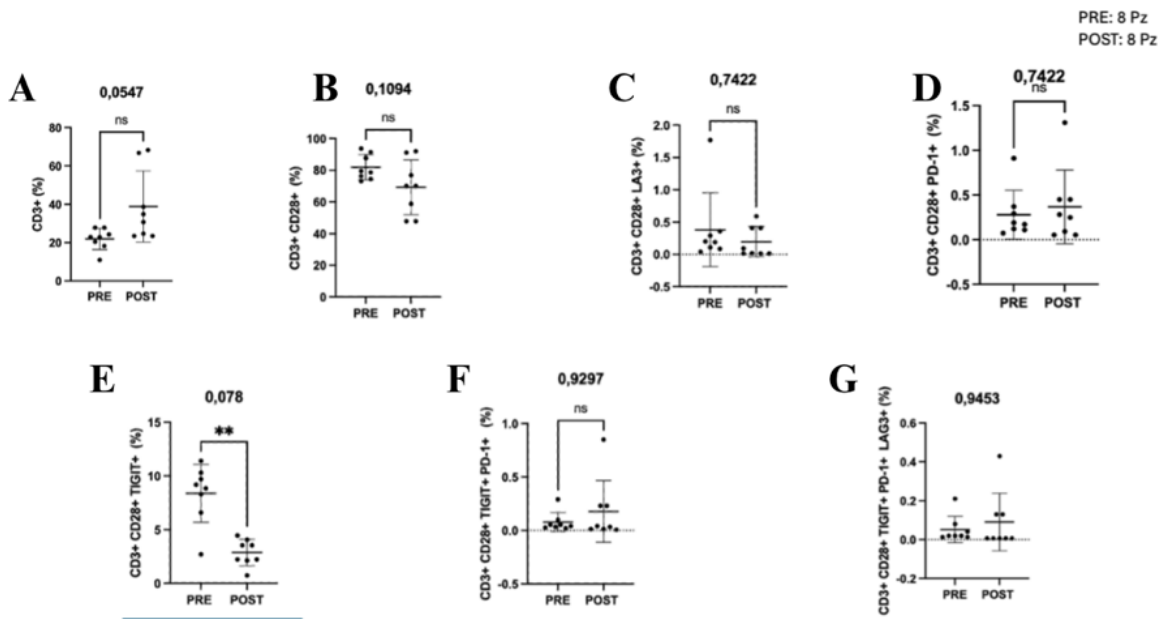


Figura 36 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD8+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno HER2+ al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST).. Frequenza in termini di percentuale (%) CD8+ (A), CD8+CD28+ (B), CD8+CD28+LAG3+ (C), CD8+CD28+PD1+ (D), CD8+CD28+TIGIT+ (E), CD8+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD8+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in PRE e POST di pazienti HER2+ (n=8).

### Popolazioni senescenti HER2+

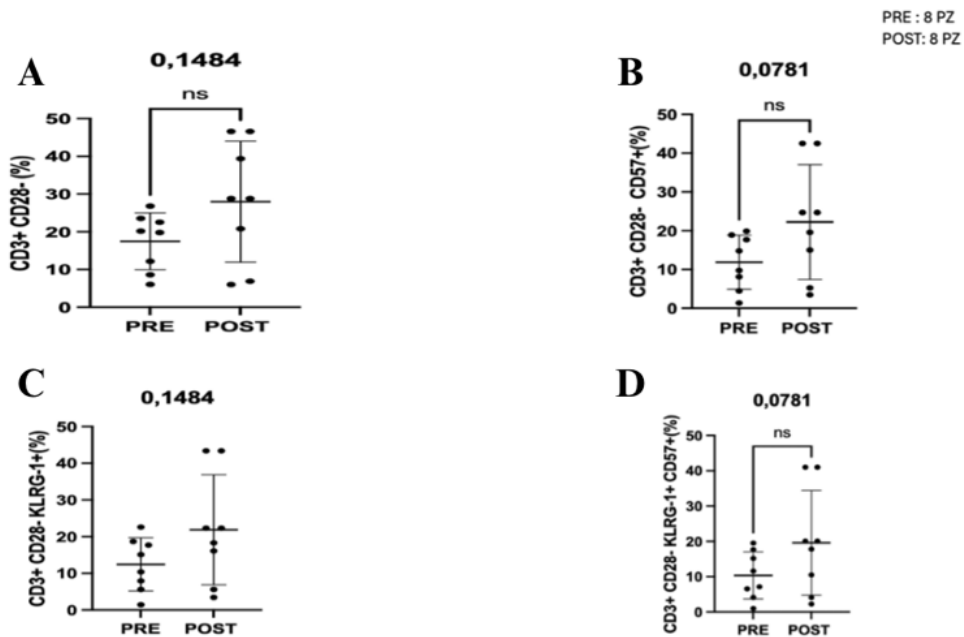


Figura 37 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD3+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno HER2+ al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) di CD3+CD28- (A), CD3+CD28-CD57+ (B), CD3+CD28-KLRG-1+ (C), CD3+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in PRE e POST in pazienti HER2+(n=8).

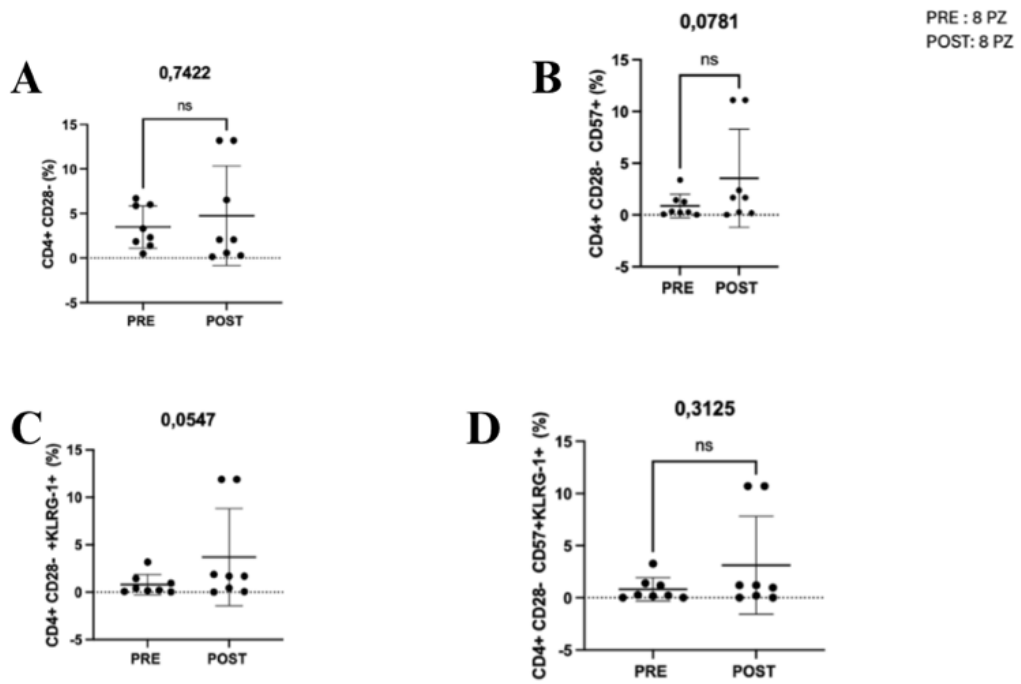


Figura 38 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD4+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno HER2+ al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) di CD4+CD28- (A), CD4+CD28-CD57+ (B), CD4+CD28-KLRG-1+ (C), CD4+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in PRE e POST in pazienti HER2+(n=8).

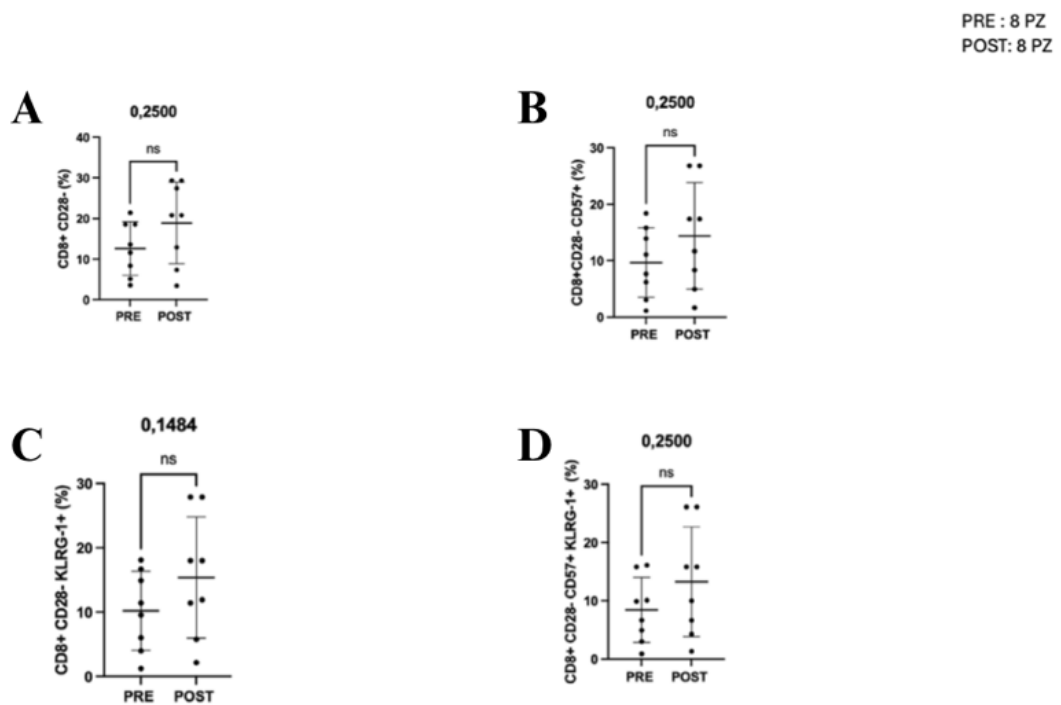


Figura 39 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD8+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno HER2+ al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) di CD8+CD28- (A), CD8+CD28-CD57+ (B), CD8+CD28-KLRG-1+ (C), CD8+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in PRE e POST in pazienti HER2+(n=8).

Tabella 13 Tabella riassuntiva dei valori di p value (PRE, POST), media (PRE, POST), e deviazione standard (PRE, POST) del confronto tra PRE ed POST in popolazioni linfociti esausti e senescenti di pazienti ER+ (n=9).

POPOLAZIONE	PRE		POST		P VALUE
	MEDIAN	SD	MEDIAN	SD	
CD3+	22,30	22,40	35,90	30,10	0,3008
CD3+ CD28+	90,80	5,677	66,50	17,14	0,0078
CD3+ CD28+ LAG3+	0,1600	1,165	0,3300	0,3253	0,9999
CD3+ CD28+ PD-1+	0,1300	0,3727	0,4200	0,4465	0,2500
CD3+ CD28+ TIGIT+	5,520	3,068	3,570	2,160	0,1289
CD3+ CD28+ PD-1+ TIGIT+	0,04700	0,04318	0,1100	0,3356	0,0742
CD3+ CD28+ PD-1+ TIGIT+ LAG3+	0,01300	0,03158	0,03300	0,2161	0,2031
CD4+	76,00	10,86	56,00	14,58	0,0039
CD4+ CD28+	67,10	10,32	54,60	12,33	0,0117
CD4+ CD28+ LAG3+	0,02000	0,07064	0,02000	0,05578	0,7969
CD4+ CD28+ PD-1	0,2700	0,3944	0,4500	0,2237	0,7344
CD4+ CD28+ TIGIT+	4,460	2,261	2,000	1,653	0,0547
CD4+ CD28+ TIGIT+ PD-1+	0,02000	0,03634	0,1400	0,1670	0,0078
CD4+ CD28+ TIGIT+ PD-1+ LAG3+	0,006670	0,01267	0,000	0,02917	0,9219
CD8+	20,60	9,547	35,10	14,77	0,0195
CD8+ CD28+	18,60	8,271	11,80	7,144	0,3008
CD8+ CD28+ PD-1+	0,06700	0,1447	0,1000	0,1000	0,9766
CD8+ CD28+ TIGIT+	1,330	1,080	0,6900	0,7440	0,3008
CD8+ CD28+ LAG3 +	0,01300	0,06181	0,05300	0,1416	0,1055
CD8+ CD28+ TIGIT+ PD-1+	0,000	0,01008	0,02700	0,1485	0,0039
CD8+ CD28+ TIGIT+ PD-1+ LAG3+	0,000	0,009357	0,01300	0,06647	0,0156
CD3+ CD28-	8,070	5,421	31,60	17,20	0,0078
CD3+ CD28- CD57+	4,730	3,807	10,80	13,69	0,0039
CD3+ CD28- KLRG-1+	5,360	3,372	19,80	15,84	0,0195
CD3+ CD28- CD57+ KLRG-1+	3,210	2,149	8,690	13,78	0,0039
CD4+ CD28-	2,190	11,10	8,730	6,031	0,6523
CD4+ CD28- CD57+	0,1700	2,722	0,3500	4,215	0,2500
CD4+ CD28- KLRG-1+	0,1600	1,251	0,4300	1,830	0,3594
CD4+ CD28- KLRG-1+ CD57+	0,1700	1,410	0,2800	1,959	0,3594
CD8+ CD28-	5,010	3,050	14,00	15,02	0,0295
CD8+ CD28- CD57+	2,690	1,887	6,370	12,17	0,0547
CD8+ CD28- KLRG-1	2,500	1,883	12,30	14,66	0,0391
CD8+ CD28- KLRG-1+ CD58+	1,810	1,733	6,690	12,08	0,1289



## Popolazioni esauste ER+

PRE: 9 Pz  
POST: 9Pz

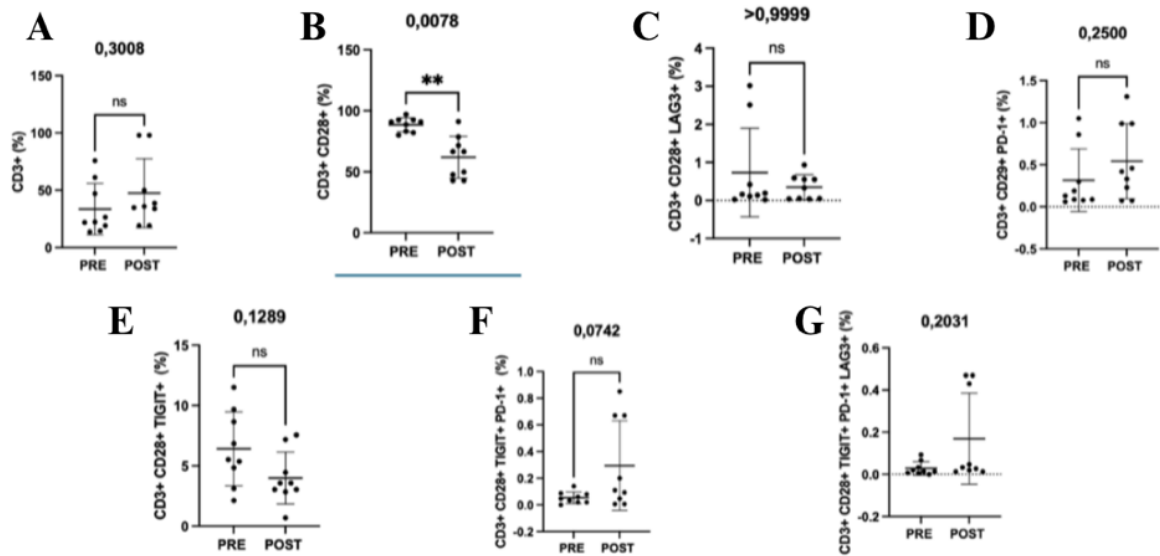


Figura 40 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD3+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno ER+ al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) CD3+ (A), CD3+CD28+ (B), CD3+CD28+LAG3+ (C), CD3+CD28+PD1+ (D), CD3+CD28+TIGIT+ (E), CD3+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD3+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in PRE e POST di pazienti ER+ (n=9).

PRE: 9 Pz  
POST: 9Pz

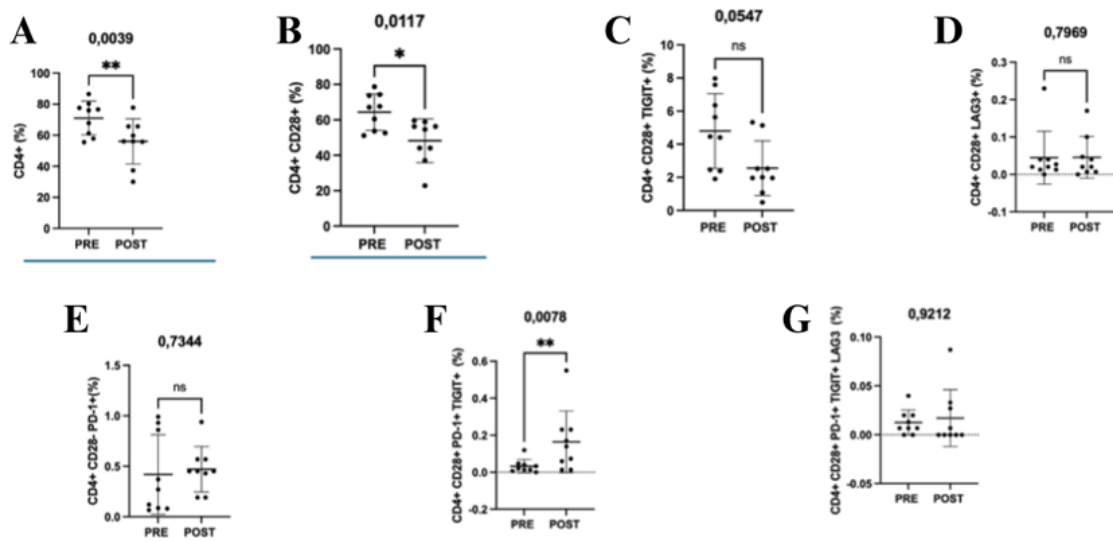


Figura 41 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD4+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno ER+ al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) CD4+ (A), CD4+CD28+ (B), CD4+CD28+LAG3+ (C), CD4+CD28+PD1+ (D), CD4+CD28+TIGIT+ (E), CD4+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD4+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in PRE e POST di pazienti ER+ (n=9).

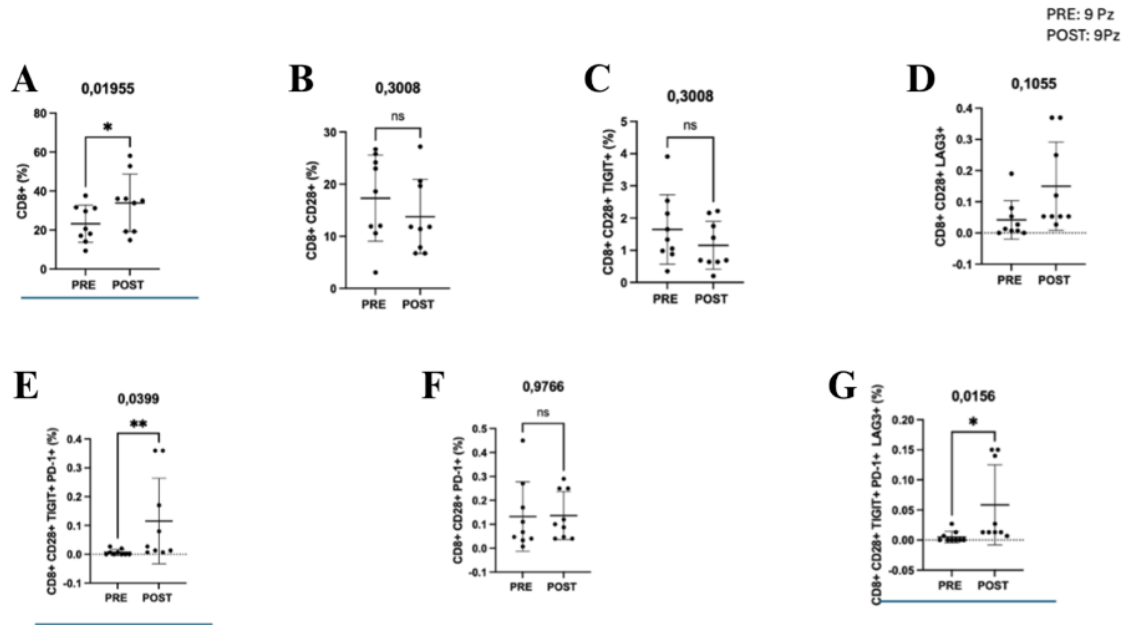


Figura 42 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD3+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno ER+ al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) CD8+ (A), CD8+CD28+ (B), CD8+CD28+LAG3+ (C), CD8+CD28+PD1+ (D), CD8+CD28+TIGIT+ (E), CD8+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD8+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in PRE e POST di pazienti ER+ (n=9).

### Popolazioni senescenti ER+

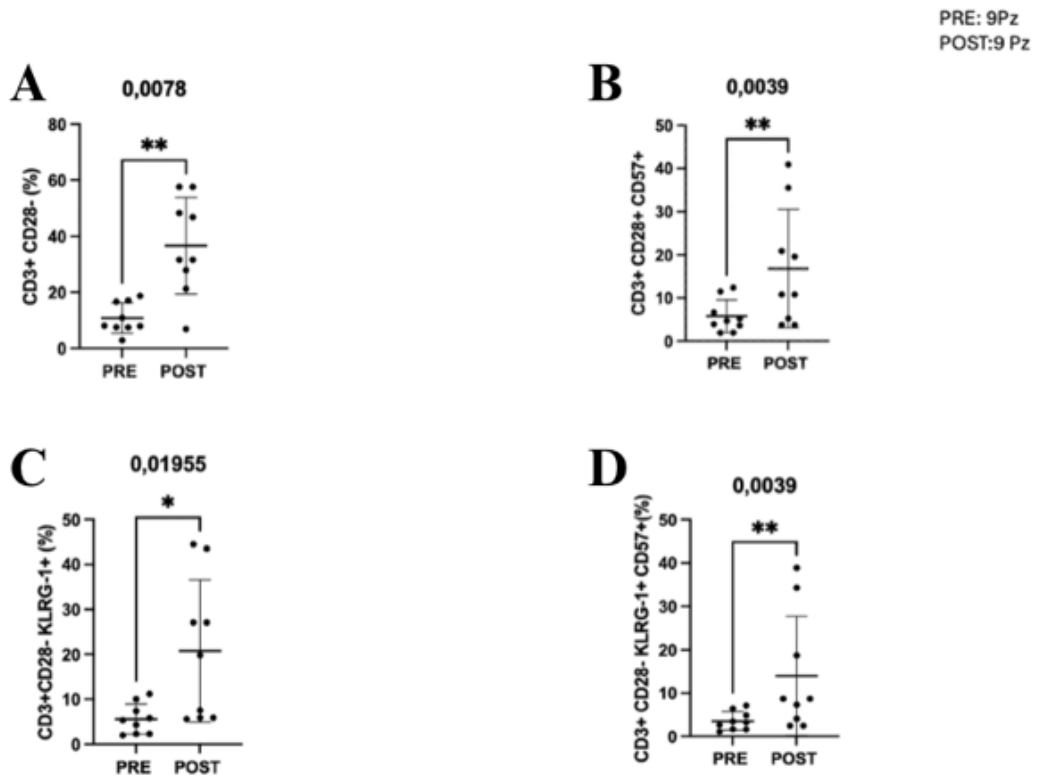


Figura 43 . Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD3+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno ER+ al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) di CD3+CD28- (A), CD3+CD28-CD57+ (B), CD3+CD28-KLRG-1+ (C), CD3+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in PRE e POST in pazienti ER+(n=9).

PRE: 9Pz  
POST: 9 Pz

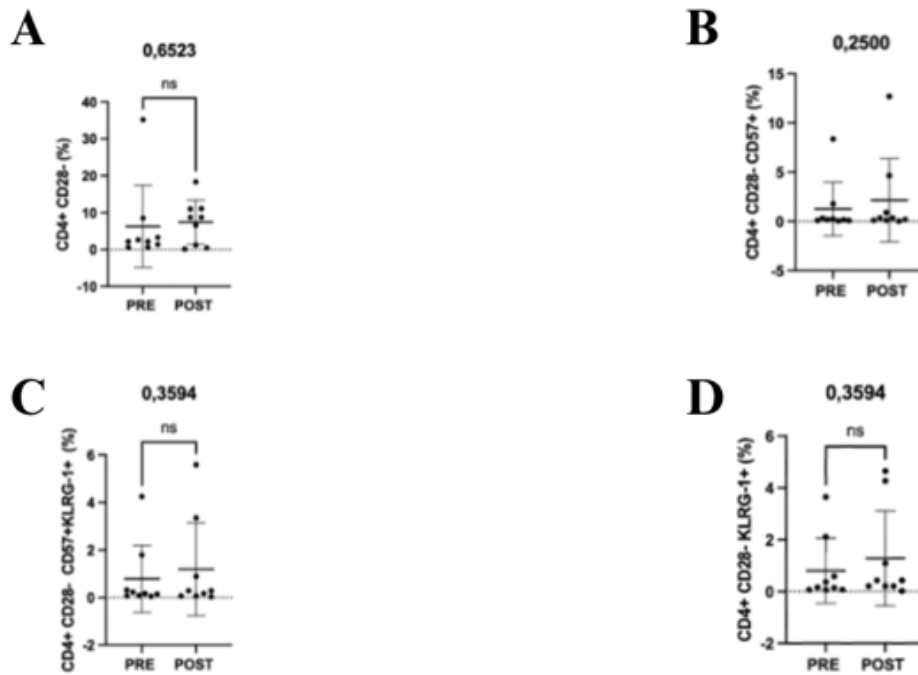


Figura 44 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD4+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno ER+ al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) di CD4+CD28- (A), CD4+CD28-CD57+ (B), CD4+CD28-KLRG-1+ (C), CD4+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in PRE e POST in pazienti ER+(n=9).

PRE: 9Pz  
POST: 9 Pz

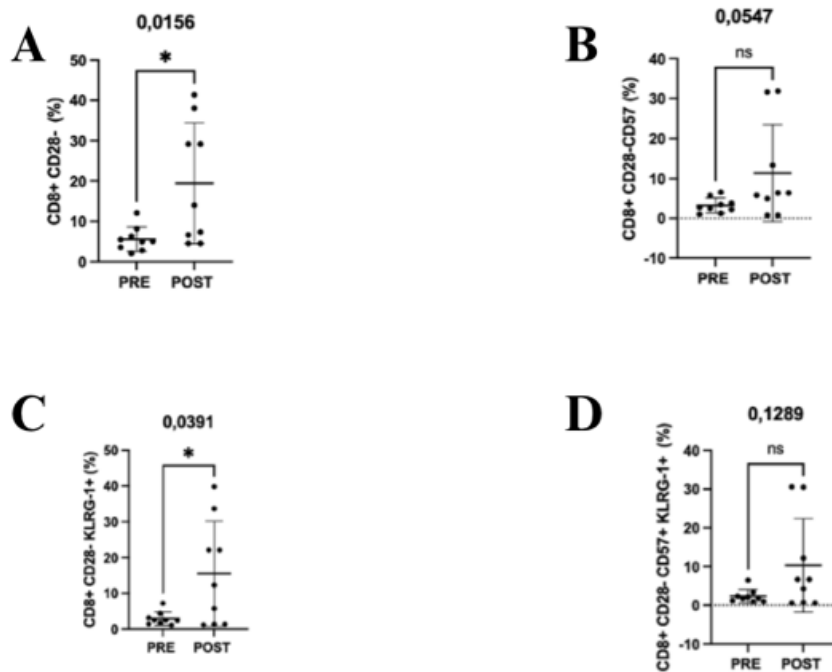


Figura 45 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD8+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno ER+ al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) di CD8+CD28- (A), CD8+CD28-CD57+ (B), CD8+CD28-KLRG-1+ (C), CD8+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in PRE e POST in pazienti ER+(n=9).

Tabella 14 Tabella riassuntiva dei valori di p value (PRE, POST), media (PRE, POST), e deviazione standard (PRE, POST) del confronto tra PRE ed POST in popolazioni linfociti esausti e senescenti di pazienti TNBC (n=8).

POPOLAZIONE	PRE		POST		P VALUE
	MEDIAN	SD	MEDIAN	SD	
CD3+	28,20	22,97	32,75	18,56	0,4609
CD3+ CD28+	80,00	14,61	78,55	21,00	0,1484
CD3+ CD28+ LAG3+	0,1415	3,531	0,07000	0,3603	0,6406
CD3+ CD28+ PD-1+	0,1850	0,3729	0,2550	0,4246	0,9999
CD3+ CD28+ TIGIT+	8,860	4,122	5,260	2,726	0,4609
CD3+ CD28+ PD-1+ TIGIT+	0,02350	0,07479	0,06300	0,03946	0,9999
CD3+ CD28+ PD-1+ TIGIT+ LAG3+	0,01300	0,01742	0,02350	0,1949	0,2188
CD4+	64,25	10,63	48,55	11,13	0,0078
CD4+ CD28+	62,65	10,54	12,69	47,60	0,0078
CD4+ CD28+ LAG3+	0,01650	0,01534	0,01300	0,05860	0,6328
CD4+ CD28+ PD-1	0,2300	0,4267	0,3200	0,1881	0,9453
CD4+ CD28+ TIGIT+	6,975	3,029	3,995	1,688	0,1953
CD4+ CD28+ TIGIT+ PD-1+	0,01650	0,03289	0,05350	0,06349	0,1562
CD4+ CD28+ TIGIT+ PD-1+ LAG3+	0,003335	0,007460	0,01300	0,02862	0,2500
CD8+	30,25	11,44	43,75	8,940	0,0234
CD8+ CD28+	14,20	7,253	29,70	11,71	0,0234
CD8+ CD28+ PD-1+	0,06650	0,1154	0,08350	0,1058	0,8438
CD8+ CD28+ TIGIT+	0,06650	0,1154	2,105	0,9788	0,0078
CD8+ CD28+ LAG3 +	0,006670	0,2049	0,04650	0,1094	0,8125
CD8+ CD28+ TIGIT+ PD-1+	0,000	0,002358	0,02350	0,05415	0,0312
CD8+ CD28+ TIGIT+ PD-1+ LAG3+	0,000	0,01011	0,01650	0,04340	0,2500
CD3+ CD28-	19,55	13,91	18,00	19,66	0,1484
CD3+ CD28- CD57+	15,30	11,85	14,64	16,65	0,3125
CD3+ CD28- KLRG-1+	15,40	13,19	14,29	18,79	0,1484
CD3+ CD28- CD57+ KLRG-1+	13,65	11,36	11,96	16,09	0,3125
CD4+ CD28-	0,7400	2,376	0,3600	2,274	0,4609
CD4+ CD28- CD57+	0,2535	1,400	0,08834	1,663	0,4688
CD4+ CD28- KLRG-1+	0,2685	1,409	0,05650	1,541	0,7422
CD4+ CD28- KLRG-1+ CD57+	0,2485	1,361	0,01984	1,243	0,1562
CD8+ CD28-	11,95	13,12	12,92	16,99	0,3125
CD8+ CD28- CD57+	9,885	11,47	10,45	14,12	0,8438
CD8+ CD28- KLRG-1	11,09	12,91	10,48	16,31	0,8125
CD8+ CD28- KLRG-1+ CD57+	9,475	11,26	8,795	13,70	0,9999

## Popolazioni esauste TNBC

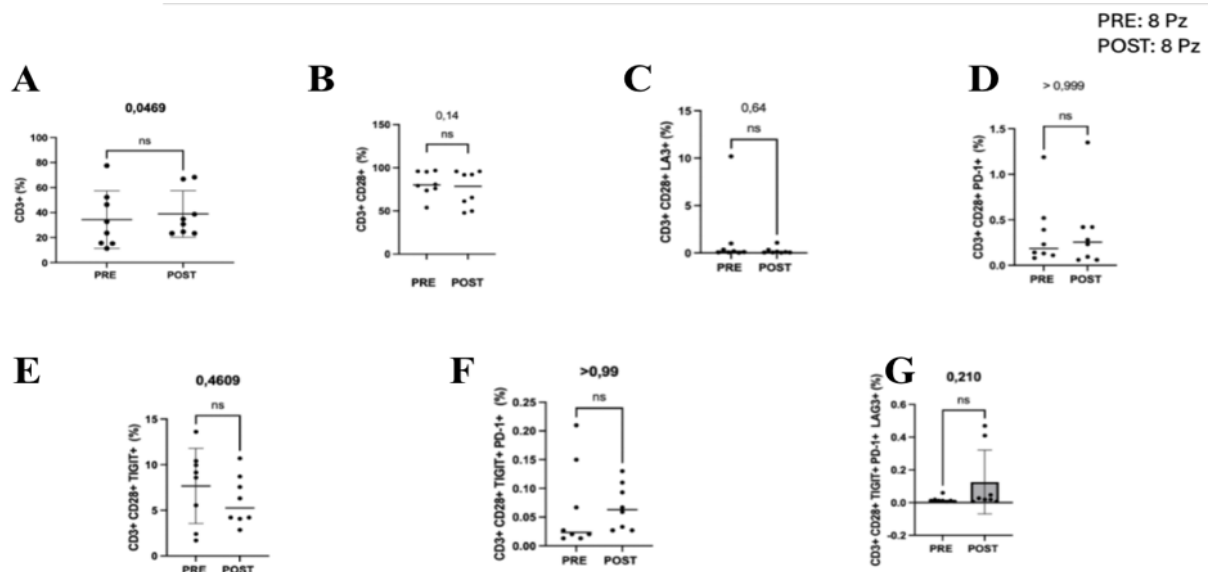


Figura 46 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD3+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno TNBC al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) CD3+ (A), CD3+CD28+ (B), CD3+CD28+LAG3+ (C), CD3+CD28+PD1+ (D), CD3+CD28+TIGIT+ (E), CD3+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD3+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in PRE e POST di pazienti TNBC (n=8).

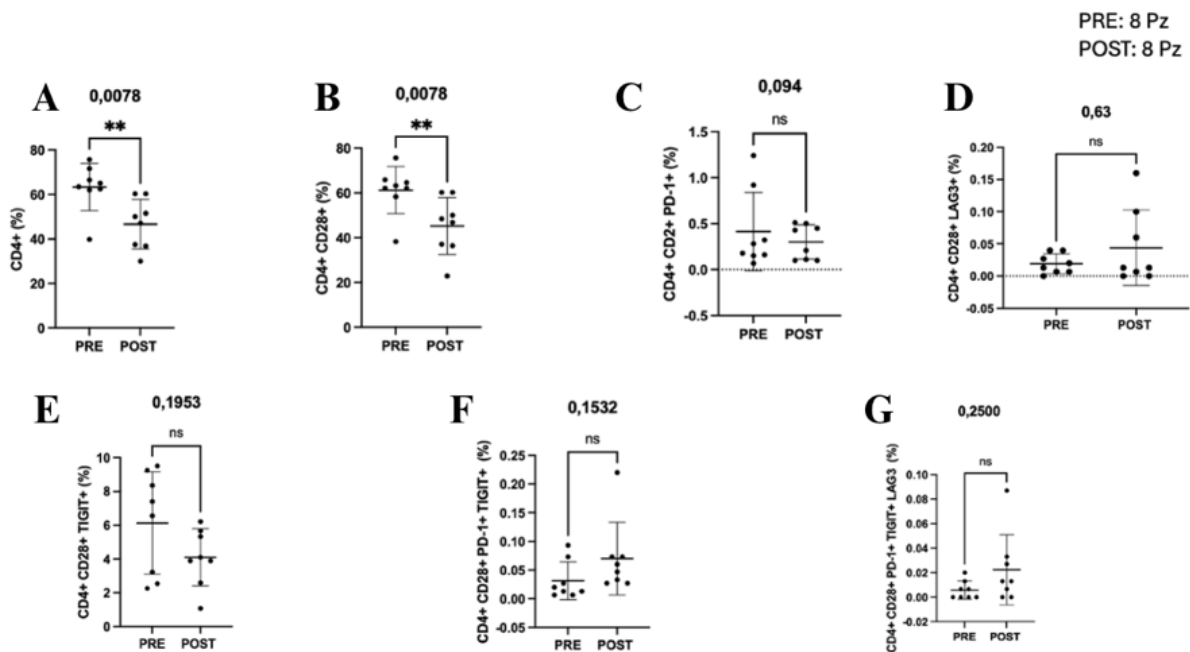


Figura 47 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD4+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno TNBC al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) CD4+ (A), CD4+CD28+ (B), CD4+CD28+LAG3+ (C), CD4+CD28+PD1+ (D), CD4+CD28+TIGIT+ (E), CD4+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD4+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in PRE e POST di pazienti TNBC (n=8).

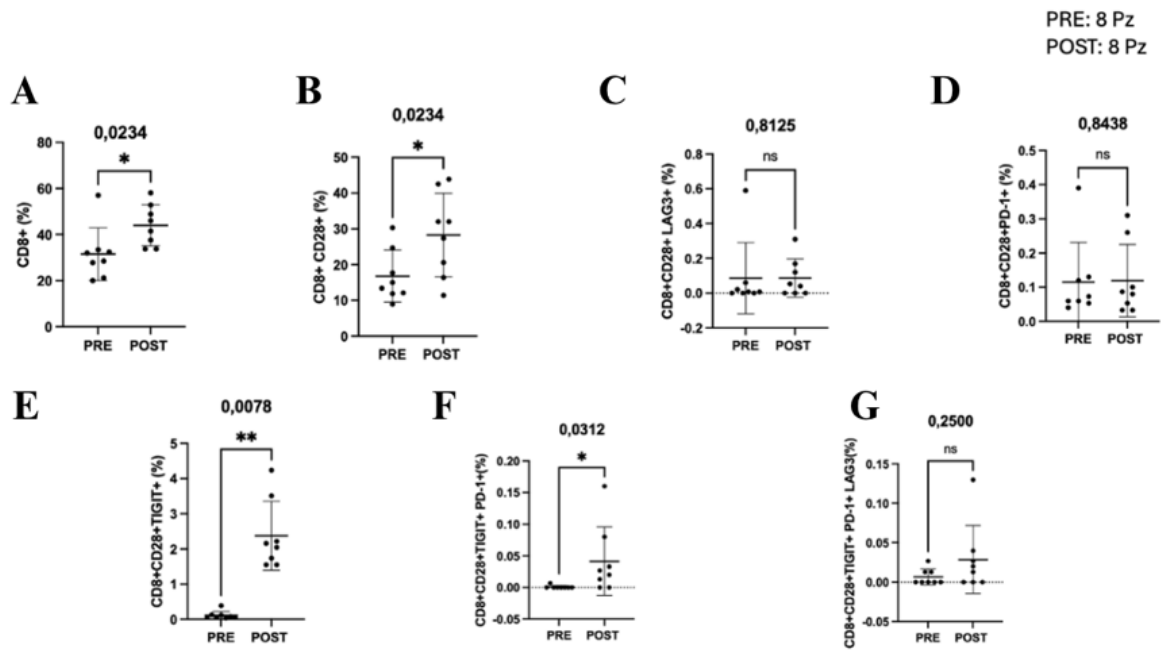


Figura 48 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD8+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno TNBC al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) CD8+ (A), CD8+CD28+ (B), CD8+CD28+LAG3+ (C), CD8+CD28+PD1+ (D), CD8+CD28+TIGIT+ (E), CD8+CD28+PD1+TIGIT+ (F) e CD8+CD28+PD1+TIGIT+LAG3+ (G) in PRE e POST di pazienti TNBC (n=8).

## Popolazioni senescenti TNBC

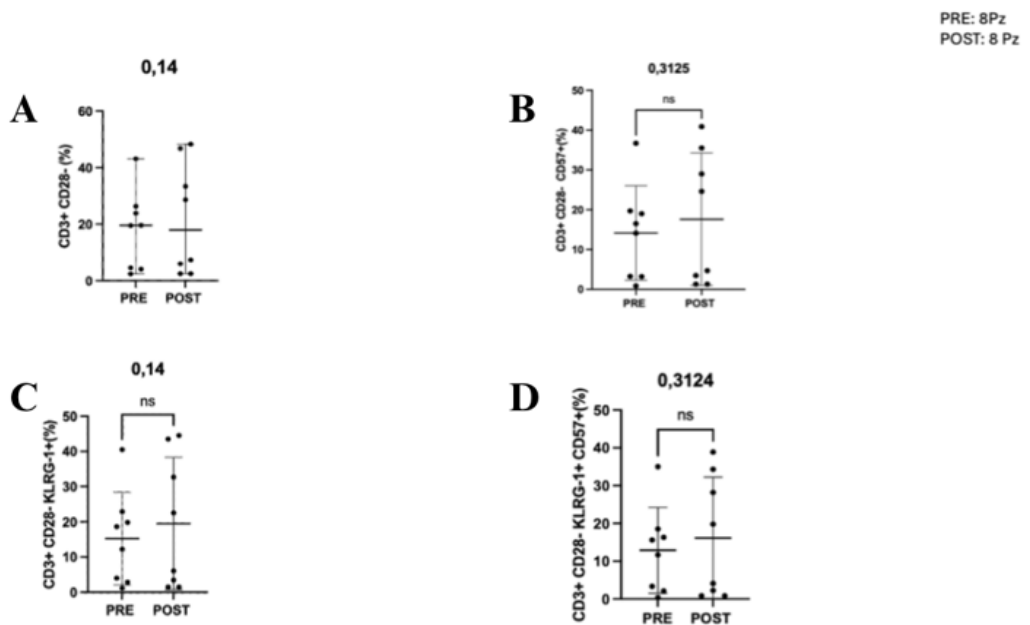


Figura 49 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD3+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno TNBC al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) di CD3+CD28- (A), CD3+CD28-CD57+ (B), CD3+CD28-KLRG-1+ (C), CD3+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in PRE e POST in pazienti TNBC (n=8).

PRE: 8Pz  
POST: 8 Pz

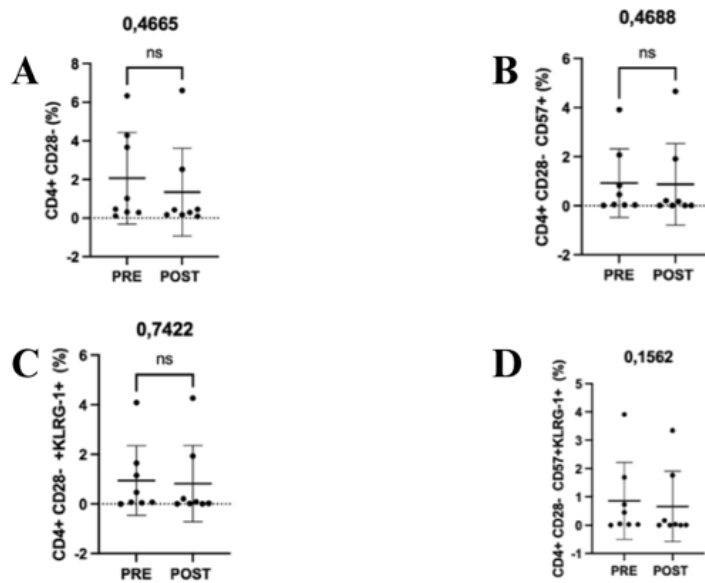


Figura 50 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD4+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno TN al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) di CD4+CD28- (A), CD4+CD28-CD57+ (B), CD4+CD28-KLRG-1+ (C), CD4+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in PRE e POST in pazienti TNBC (n=8).

PRE: 8Pz  
POST: 8 Pz

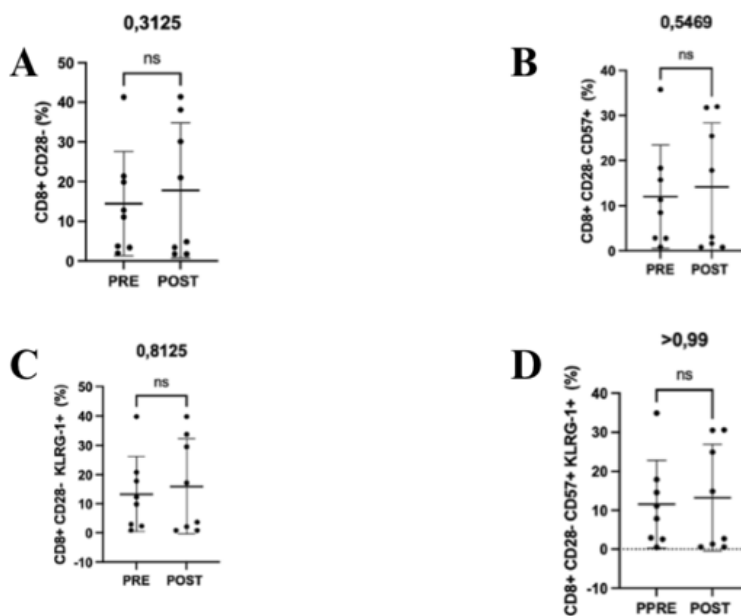


Figura 51 Grafici della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T CD8+ analizzate nel sottotipo molecolare di tumore al seno TN al baseline (PRE) e a seguito della terapia (POST). Frequenza in termini di percentuale (%) di CD8+CD28- (A), CD8+CD28-CD57+ (B), CD8+CD28-KLRG-1+ (C), CD8+CD28-KLRG-1+CD57+ (D) in PRE e POST in pazienti TNBC (n=8).

Abbiamo dimostrato che nel gruppo di pazienti B (HER2+) dopo la terapia la frequenza delle cellule a fenotipo “*exhaustion like*” (CD3+TIGIT+, CD4+CD28+, CD4+TIGIT+, Tabella 12, Figure 34 e 35; *Wilcoxon test paired*, P= 0,0078, 0,0078, 0,0078) diminuisce, mentre aumenta quella delle cellule CD4+CD57+ “*senescent like*” (Tabella 12, Figura 38 ; *Wilcoxon test paired*, P= 0,0781).

Per quanto riguarda i gruppi C (ER+) e A (TNBC), non abbiamo evidenziato significative differenze nella frequenza delle sottopopolazioni a fenotipo senescente, mentre si apprezza una diminuzione di linfociti T CD4+ (CD4+CD28+TIGIT+, Tabella 13 e 14; Figura 40 e 41; *Wilcoxon test paired*, P=0,0547; 0,1953) e un aumento di quelli CD8+ (CD8+TIGIT+PD1+) a fenotipo “*exhaustion like*” dopo terapia (Tabella 13 e 14; Figura 42 e 48, *Wilcoxon test paired*, P=0,0039; 0,0312). Abbiamo anche evidenziato una significatività diminuzione dei linfociti T CD4+ a fenotipo attivo (CD4+CD28+) in entrambi i gruppi ER+ e TNBC+ dopo terapia (Tabella 13 e 14, Figura 41 e 47, *Wilcoxon test paired*, P=0,0117; 0,0078).



#### **4.5 Analisi delle sottopopolazioni di MDSC prima dell'inizio della terapia nei sottotipi tumore al seno**

Al fine di caratterizzare le popolazioni di MDSC nei pazienti con tumore al seno, mediante citofluorimetria abbiamo valutato la frequenza in termini di percentuale (%) del sottogruppo cellulare di MDSC PMN-MDSC e M-MDSC sia tra le due tipologie cellulari sia nei tre sottotipi di tumore al seno dei pazienti, gruppo A TNBC (n=27) gruppo B HER2+ (n=29) e gruppo C ER+ (n=16), al fine di valutare il valore prognostico delle cellule prima del trattamento Neoadiuvante.

In tabella 15 (*Mann-Whitney test*) sono riportati la mediana, la deviazione standard ed il p value al fine del confronto delle percentuali (%) delle sottopopolazioni di MDSC nei 3 sottotipi molecolari del tumore, rappresentate in figura 52.

In tabella 16 (*Kruskal-Wallis Test*) sono riportati i valori di mediana, deviazione standard e p value delle due popolazioni di cellule analizzate. Rappresentate in figura 52.

I dati dell'analisi ci indicano una differenza significativa al baseline tra le due sottopopolazioni di MDSC (PMN-MDSC e M-MDSC) (tabella 15, figura 52,  $1,289 \pm 0,7577$   $p < 0,00$ ) (tabella 15, figura 52,  $1,550 \pm 0,9976$   $p < 0,00$ ) (tabella 15, figura 52,  $1,538 \pm 0,9758$   $p = 0,0006$ ) dove si evidenzia un maggior numero di M-MDSC in tutti i gruppi A, B e C dei sottotipi molecolari.

Mentre non si registrano significatività tra il numero di cellule MDSC (PMN-MDSC e M-MDSC) nelle sue due sottopopolazioni tra i tre gruppi di sottotipo molecolare, il che indica che la tipologia di sottotipo non sia un fattore predittivo in quanto non sono presenti differenze tra i gruppi. (tabella 16, figura 52)

Tabella 15 Tabella riassuntiva dei valori di p value, mediana, e deviazione standard) del confronto in percentuale (%) delle cellule MDSC (PMN-MDSC e M-MDSC) nei 3 sottotipi molecolari dei pazienti TNBC n=27, HER2+=29 e ER+ n=16

SOTTOTIPO MOLECOLARE	PMN-MDSC		M-MDSC		P VALUE
	MEDIANA	DS	MEDIAN	DS	
TNBC	0,3596	0,3660	1,289	0,7577	<b>&lt;0,001</b>
HER2+	0,2938	0,5273	1,550	0,9976	<b>&lt;0,001</b>
ER+	0,6506	1,205	1,538	0,9758	<b>0,006</b>

Tabella 16 Tabella riassuntiva dei valori di p value, mediana, e deviazione standard) del confronto in percentuale (%) delle cellule MDSC (PMN-MDSC e M-MDSC) tra i 3 sottotipi molecolari dei pazienti con tumore al seno TNBC n=27, HER2+=29 e ER+ n=16

POPOLAZIONE	TNBC		HER2+		ER+		P VALUE
	MEDIANA	DS	MEDIANA	DS	MEDIANA	DS	
PMN- MDSC	0,2400	0,3660	0,1700	0,5273	0,1350	1,205	0,3734
M-MDSC	1,070	0,7577	1,260	0,9976	1,325	0,9758	0,6765

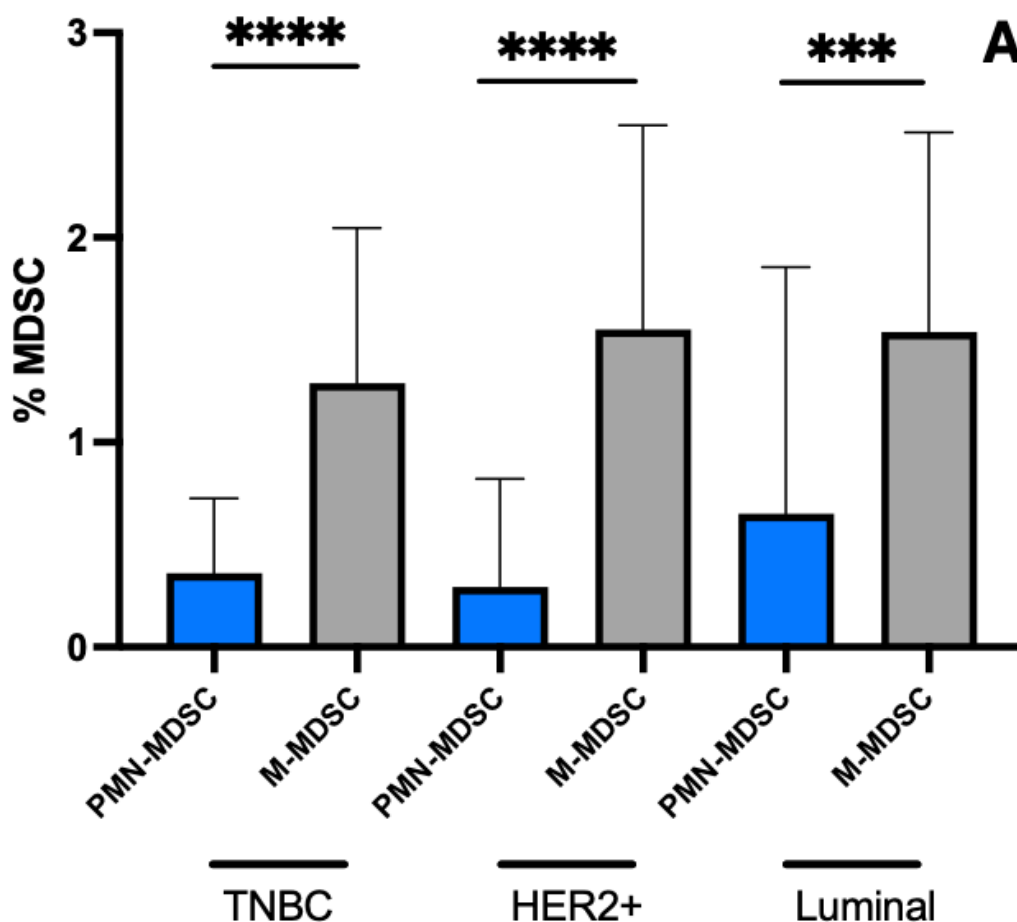


Figura 52 il grafico rappresenta il confronto in percentuale (%) delle cellule MDSC (PMN-MDSC e M-MDSC) nei 3 sottotipi molecolari dei pazienti TNBC n=27, HER2+=29 e ER+ n=16.

#### **4.6 Valutazione della frequenza delle sottopopolazioni di cellule MDSC prima e dopo la terapia.**

Al fine di caratterizzare la frequenza in termini di percentuale (%) delle sottopopolazioni di cellule MDSC, M-MDSC e PMN- MDSC prima e dopo la terapia e valutare eventuali correlazioni al fine prognostico, mediante la tecnica di citometria a flusso abbiamo analizzato la frequenza delle sottopopolazioni di cellule MDSC (in termini di percentuale) (%) sia prima dell'inizio della terapia (*baseline*) sia dopo la terapia (POST) nei pazienti divisi in 3 gruppi, pazienti totali senza distinzione di esito della terapia (A, *overall* n=72), pazienti che hanno avuto una risposta patologica completa (B, pCR n=37) e pazienti che hanno una malattia residua dopo la terapia (C, (*Residual Disease* – RD, n=34) e un paziente NA (*not available*)

Nella tabella 17 *Mann-Whitney-test*, sono riportate le medie, le deviazioni standard e p value di tutte le sottopopolazioni di MDSC analizzate per i 3 gruppi di pazienti, mentre in Figura 53 sono riportati i grafici in dettaglio per ogni sottopopolazione analizzata.

L'analisi effettuata ha evidenziato significatività statistiche per quanto riguarda la diminuzione della sottopopolazione PNM-MDSC dopo la terapia del gruppo di pazienti totali (*Overall*) (Tabella 17, Figura 53 (A)  $0,2100 \pm 0,6965$ ,  $p=0,0590$ ) ed anche nei pazienti che hanno raggiunto la condizione di risposta patologica completa dopo la terapia (pCR) nella sottopopolazione M-MDSC (Tabella 17, Figura 53- B).

Tabella 17 Tabella riassuntiva dei valori di p value, mediana, e deviazione standard del confronto in percentuale (%) delle cellule MDSC (PMN-MDSC e M-MDSC) al baseline ed al termine della terapia tra i pazienti con tumore al seno totali (overall n= 72), con risposta patologica completa (pCR, n=37) e con residui di malattia (RD n=34).

PAZIENTI	PRE/POST	PMN-MDSC		M-MDSC		P-VALUE PMN- MDSC	P- VALUE M-MDSC
		MEDIANA	DS	MEDIANA	DS		
Overall	Pre	0,2100	0,6965	1,255	0,9053	<b>0,0590</b>	0,1861
	Post	0,2800	0,4620	1,095	0,9082		
pCR	Pre	0,1400	0,7091	1,260	0,9553	0,1363	<b>0,0395</b>
	Post	0,2800	0,1847	1,070	0,7355		
RD	Pre	0,2600	0,6982	1,265	0,8567	0,2101	0,9294
	Post	0,2950	0,6297	1,305	1,049		

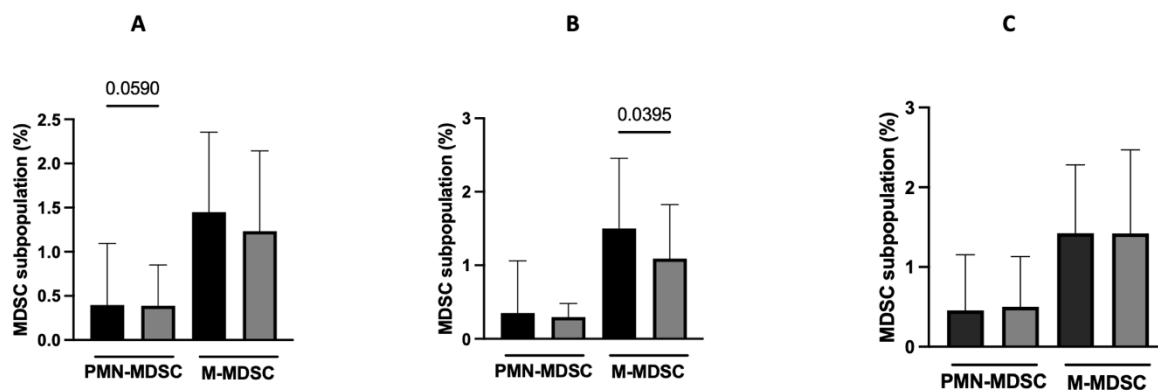


Figura 53 I grafici rappresentano confronto in percentuale (%) delle cellule MDSC (PMN-MDSC e M-MDSC) al baseline ed al termine della terapia tra i pazienti con tumore al seno totali (overall n= 72) figura(A), con risposta patologica completa (pCR, n=37) figura (B) e con residui di malattia (RD n=34), figura (C).

Per un'indagine più accurata, i pazienti sono stati stratificati in base al fenotipo molecolare del tumore che presentano, quindi divisi in 3 gruppi: TNBC (A n overall= 27, n pCR= 15, n RD= 12), HER2+ ( B n overall= 29, n pCR=17, n Rd=11 e NA=1) e ER+ ( C n overall=16, n pCR=5, n RD=11).

L'analisi è stata svolta al fine di ricercare delle differenze significative della frequenza in termini di percentuale (%) tra le sottopopolazioni cellulari di MDSC prima e dopo il trattamento con la chemioterapia neoadiuvante per avere un'indicazione prognostica in base al comportamento delle cellule e correlarle eventualmente con il sottotipo molecolare di tumore.

Nella tabella (*Wilcoxon Test*), sono riportate le medie, le deviazioni standard e p value di tutte le sottopopolazioni di MDSC analizzate per i 3 gruppi di pazienti, mentre in Figura 54 sono riportati i grafici in dettaglio per ogni sottopopolazione analizzata.

L'analisi effettuata ha evidenziato significatività statistiche per quanto riguarda la diminuzione di ambedue le popolazioni di MDSC (M-MDSC e PNM-MDSC) dopo la terapia del gruppo B, (HER2+) sia nel gruppo dei pazienti totali (*Overall*) (Tabella 18, Figura 54  $0,1700 \pm 0,5237$ ,  $0,2800 \pm 0,1821$   $p=0,0370$ ) (Tabella 18, Figura 54  $1,260 \pm 0,9976$ ,  $0,600 \pm 0,6884$   $p=0,040$ ) sia anche nel gruppo dei pazienti B, HER2+ stratificati che hanno raggiunto la condizione di risposta patologica completa dopo la terapia (pCR) nella popolazioni di M-MDSC (Tabella 18, Figura 54  $1,400 \pm 0,1030$   $0,900 \pm 0,5930$   $p=0,0169$ ), il che può risultare interessante al fine prognostico per una relazione con l'abbassamento delle cellule e il buon esito del trattamento.

Tabella 18 Tabella riassuntiva dei valori di p value, mediana, e deviazione standard del confronto in percentuale (%) delle cellule MDSC (PMN-MDSC e M-MDSC) al baseline ed al termine della terapia tra i pazienti con tumore al seno stratificati per sottotipo molecolare e per risposta patologica completa e con residui di malattia (TNBC overall n= 27, pCR n= 15 e RD n=12), (HER2+ n=29, pCR=17 e RD= 11 e NA=1) e (ER overall n=16, pCR=5 e RD=11).

PAZIENTI	PRE/POST	PMN-MDSC		M-MDSC		P-VALUE PMN-MDSC	P- VALUE M-MDSC
		MEDIANA	DS	MEDIANA	DS		
Overall TNBC	Pre	0,2400	0,3660	1,070	0,7577	0,5291	0,2873
	Post	0,3600	0,6162	1,360	0,9310		
pCR TNBC	Pre	0,1700	0,4045	1,010	0,8560	0,2971	0,8793
	Post	0,3600	0,2096	1,210	0,7983		
RD TNBC	Pre	0,3600	0,3109	1,195	0,6509	0,9849	0,1763
	Post	0,3150	0,8850	1,930	1,013		
Overall HER2+	Pre	0,1700	0,5273	1,260	0,9976	0,0370	0,040
	Post	0,2800	0,1821	0,6000	0,6884		
pCR HER2+	Pre	0,1300	0,1728	1,400	1,030	0,1231	0,0169
	Post	0,2810	0,1762	0,9000	0,5930		
RD HER2+	Pre	0,2500	0,8232	1,250	0,9751	0,1191	0,1475
	Post	0,3700	0,1849	0,5300	0,8597		
Overall ER2+	Pre	0,1350	1,205	1,325	0,9758	0,5366	0,8209
	Post	0,2750	0,5145	1,260	0,9900		
pCR ER2+	Pre	0,3600	1,756	1,240	1,040	0,6250	0,8125
	Post	0,2600	0,1539	1,590	0,8714		
RD ER2+	Pre	0,1200	0,9077	1,410	0,9898	0,2334	0,8984
	Post	0,2900	0,6071	0,9300	1,076		

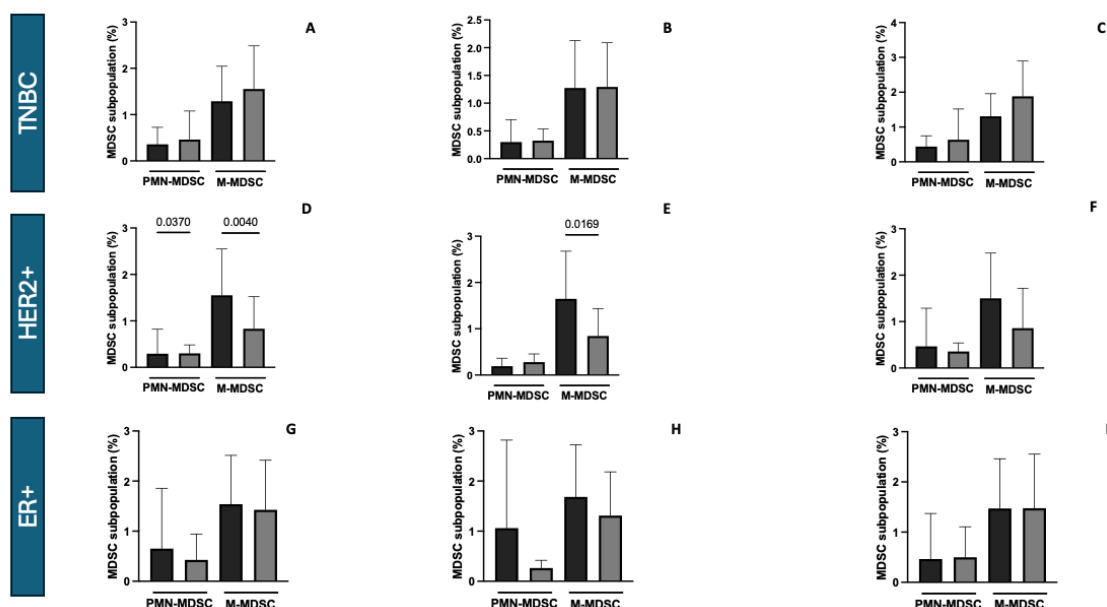


Figura 54 grafici che rappresentano del confronto in percentuale (%) delle cellule MDSC (PMN-MDSC e M-MDSC) al baseline ed al termine della terapia tra i pazienti con tumore al seno stratificati per sottotipo molecolare e per risposta patologica completa e con residui di malattia (TNBC overall n= 27, (figura A) pCR n= 15 (figura B) e RD n=12) (figura C), (HER2+ n=29 (figura D), pCR=17 (figura E) e RD= 11 (figura F) e NA=1) e (ER overall n=16, (figura G) pCR=5 (figura H) e RD=11 (figura I)).

## 5. Discussione

Il carcinoma alla mammella non metastatico è una forma di cancro al seno che non si è diffuso oltre il tessuto mammario o i linfonodi circostanti.

Questo tipo di tumore è limitato alla mammella stessa e può essere classificato ulteriormente in base al tipo di cellule coinvolte e alla loro estensione all'interno del seno. Le forme più comuni includono il carcinoma duttale in situ, confinato ai dotti mammari, e il carcinoma lobulare in situ, che coinvolge i lobuli mammari.

La diagnosi precoce e il trattamento tempestivo sono fondamentali per aumentare le probabilità di guarigione e prevenire la progressione del tumore verso uno stadio metastatico. Le opzioni di trattamento possono includere la chirurgia, la radioterapia, la chemioterapia e la terapia ormonale, spesso in combinazione, a seconda delle caratteristiche specifiche del tumore e delle condizioni della paziente.<sup>8</sup>

La chemioterapia neoadiuvante (NAC) è un trattamento sistemico considerato il *gold standard* per il cancro al seno non metastatico. Viene utilizzata anche quando il tumore è operabile fin da subito, poiché consente di eseguire interventi chirurgici più conservativi, meno invasivi e più rapidi sulla mammella rispetto ad altre strategie terapeutiche, garantendo comunque gli stessi benefici in termini di sopravvivenza per i pazienti. L'obiettivo principale di questa terapia è ottenere una risposta patologica completa (pCR), ovvero l'assenza di malattia evidente (ypT0 ypN0).

Purtroppo, nonostante i progressi fatti sia a livello diagnostico che di interventi terapeutici, non sempre si è in grado di diagnosticare in tempo e tenere monitorata la malattia e non tutti i pazienti rispondono alla terapia. Per cui l'identificazione di fattori prognostici e predittivi possono permettere di personalizzare il trattamento, migliorando l'efficacia e riducendo gli effetti collaterali.

Con tali premesse in questa tesi abbiamo voluto indagare l'impatto delle cellule circolanti del sistema immunitario in funzione del trattamento neoadiuvante in pazienti con tumore al seno, in particolare caratterizzando i linfociti T senescenti ed esausti e le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSCs).

L'importanza delle cellule T senescenti ed esauste, insieme alle cellule mieloidi soppressori derivate da precursori (MDSC), nel contesto del cancro al seno è un tema di crescente interesse nella ricerca oncologica.<sup>14</sup>

La letteratura scientifica suggerisce che queste cellule giocano un ruolo cruciale nel modulare la risposta immunitaria contro il tumore. In particolare, le cellule T senescenti, attraverso il rilascio di molecole pro-infiammatorie, quelle T esauste, con la loro ridotta capacità di attaccare le cellule tumorali, e le MDSC che sopprimono attivamente le risposte immunitarie antitumorali, facilitando la progressione tumorale.

Comprendere il ruolo di queste cellule è fondamentale per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche che possano migliorare l'efficacia delle attuali terapie contro il cancro al seno.<sup>17</sup>

È stato dimostrato che pazienti con tumore al seno, presentano un'aumento di linfociti T CD4+ con fenotipo senescente (CD57+KLRG1+) sia a livello di infiltrato tumorale che nel sangue periferico e che questi valori possono essere rilevanti a livello prognostico perché rilasciano segnali pro-infiammatori e immunosoppressivi.<sup>38</sup>



In questa tesi abbiamo dimostrato che nei pazienti con carcinoma mammario triplo negativo (TNBC), sottotipo a prognosi più sfavorevole, la frequenza dei linfociti T citotossici senescenti (CD8+CD28-CD57+KLRG1+) è significativamente più alta rispetto ai pazienti con carcinoma mammario positivo per i recettori degli estrogeni (ER+). Tali risultati, in linea con quanto già dimostrato in letteratura, sembrano suggerire che la presenza di linfociti T senescenti circolanti, soprattutto CD8+, sia associata alla progressione del tumore.<sup>39,40, 41</sup>

Abbiamo dimostrato inoltre che nei pazienti che non rispondono alla terapia neoadiuvante, con malattia residua, la percentuale di linfociti T CD4+CD28+ e CD8+CD28+TIGIT+ è maggiore rispetto a quelli che rispondono. Per cui, si potrebbe ipotizzare che, la mancata risposta alla terapia potrebbe essere associata alla persistente attivazione e proliferazione di cellule T attivate, infatti il CD28 è la molecola costimolatoria primaria per le cellule T naive, e questa continua stimolazione induce un aumento delle cellule T esauste, soprattutto CD8 che sono i linfociti maggiormente coinvolti nella risposta anti-tumorale.<sup>42, 43, 44, 45</sup>

Abbiamo inoltre dimostrato che i linfociti T CD8+ esausti positivi per TIGIT+, LAG3+ e PD-1+ e i CD4+ senescenti aumentano dopo terapia. Tali dati sono in accordo con quanto già dimostrato in letteratura, ovvero che la terapia neoadiuvante induce un aumento delle cellule senescenti ed esauste.

Un aumento significativo delle cellule senescenti potrebbe suggerire una risposta intensa al trattamento, ma potrebbe anche indicare la presenza di cellule tumorali resistenti al trattamento. Il processo di esaurimento è parzialmente reversibile per cui e dipende dal contesto. Studi preclinici e clinici, in particolare nell'ambito dell'immunoterapia del cancro, hanno dimostrato che bloccare le vie inibitorie (come PD-1/PD-L1 o CTLA-4) può ripristinare almeno parzialmente la funzione dei linfociti T esausti. Tuttavia, non tutti i linfociti T esausti rispondono a questi trattamenti, e il grado di recupero funzionale può variare. E' stato dimostrato che nei pazienti HER2+ trattati con terapia neoadiuvante, si osserva un'riduzione di espressione dei marcatori di exhaustion sulla superficie dei linfociti T, come CTLA4+, LAG3+, PD-1+ e TIM3+.<sup>46, 47, 48</sup>

Le MDSC (Cellule Soppressorie Derivate da Mieloidi) sono note per il loro ruolo chiave nell'immunosoppressione, poiché inibiscono l'attivazione e la funzione delle cellule T, fondamentali per la risposta immunitaria contro i tumori. Questo le rende particolarmente rilevanti nel contesto delle terapie antitumorali, dove la loro presenza può limitare l'efficacia del trattamento.

I nostri risultati mostrano che, indipendentemente dal fenotipo molecolare (TNBC, HER2+ e ER+), i pazienti hanno un numero maggiore di M-MDSC rispetto ai PMN-MDSC al basale. <sup>49, 50</sup>

Inoltre, abbiamo dimostrato che la frequenza delle M-MDSC diminuisce dopo terapia nel gruppo di pazienti che rispondono alla terapia, suggerendo che, da un punto di vista biologico, queste cellule possano essere associate ad un miglioramento della condizione clinica.

Numerosi studi in letteratura supportano l'ipotesi che la riduzione delle MDSC durante la terapia neoadiuvante possa essere attribuita a vari fattori, tra cui l'eliminazione diretta delle cellule da parte del trattamento stesso e la riduzione dei fattori di crescita dovuta al cambiamento nel microambiente tumorale e ai meccanismi di escape cellulare. <sup>51, 39, 52, 53</sup>

In conclusione, il nostro studio ha messo in luce il potenziale ruolo delle cellule T senescenti ed esauste e MDSCs circolanti come importanti fattori predittivi di risposta alla terapia neoadiuvante nel carcinoma mammario non metastatico.

Questi risultati aprono la strada a nuovi approcci biologici e medico-traslazionali per sviluppare terapie personalizzate per il carcinoma mammario. Tuttavia, è fondamentale riconoscere i limiti della nostra ricerca, che richiede ulteriori studi per validare questi biomarcatori. In particolare, è fondamentale condurre le stesse analisi su tessuto in modo da confrontare i risultati della caratterizzazione delle cellule T e MDSCs ottenuti su sangue periferico con le popolazioni dei Linfociti Infiltranti il Tumore (TILs). Tali analisi forniranno ulteriori informazioni cruciali, permettendo di esaminare direttamente le dinamiche tra cellule tumorali e sistema immunitario.

Un'indagine approfondita di queste interazioni potrebbe rivelare non solo l'eterogeneità intra-tumorale, ma anche l'influenza dei marcatori molecolari e cellulari sulla progressione del tumore e sulla risposta ai trattamenti. Tale conoscenza non solo favorirebbe lo sviluppo di terapie mirate, ma potrebbe anche ottimizzare i protocolli di trattamento esistenti.

Per concludere, questi studi saranno essenziali per migliorare gli esiti clinici delle pazienti con carcinoma mammario, permettendo un approccio terapeutico sempre più personalizzato e basato su evidenze scientifiche solide. La comprensione più profonda del microambiente tumorale e delle interazioni cellulari aprirà nuove frontiere nella lotta contro il carcinoma mammario, migliorando la qualità della vita e la sopravvivenza delle pazienti.

## 6. Sitografia

1. Tumore al seno: sintomi, prevenzione, cause, diagnosi  
<https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-del-seno>.
2. ESMO ESMO Clinical Practice Guidelines: Breast Cancer.  
<https://www.esmo.org/guidelines/guidelines-by-topic/esmo-clinical-practice-guidelines-breast-cancer>.
3. Panoramica sulle patologie mammarie - Problemi di salute delle donne - Manuale MSD, versione per i pazienti <https://www.msdmanuals.com/it-it/casa/problemi-di-salute-delle-donne/patologie-mammarie/panoramica-sulle-patologie-mammarie>.
4. AIOM 2023\_AIOM\_NDC.
5. Tumore al seno, tutti i fattori di rischio - Humanitas San Pio X  
<https://www.humanitas-sanpiox.it/news/tumore-al-seno-tutti-i-fattori-di-rischio/>.
6. Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., et al. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis* 5, 77–106. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>.
7. Loibl, S., Poortmans, P., Morrow, M., Denkert, C., and Curigliano, G. (2021). Breast cancer. *Lancet* 397, 1750–1769. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32381-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32381-3).
8. LINEE GUIDA NEOPLASIE DELLA MAMMELLA I AIOM  
<https://www.aiom.it/linee-guida-aiom-2021-neoplasie-della-mammella/>.
9. Smolarz, B., Nowak, A.Z., and Romanowicz, H. (2022). Breast Cancer- Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers (Basel)* 14, 2569. <https://doi.org/10.3390/cancers14102569>.
10. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26253814/>.
11. Tumore al seno: gli stadi e le terapie per ciascuno di essi I Fondazione Umberto Veronesi <https://www.fondazioneveronesi.it/magazine/articoli/lesperto-risponde/tumore-al-seno-quali-sono-gli-stadi-e-le-terapie-per-ciascuno-di-essi>.
12. Early breast cancer - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16622745/>.

13. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29096890/>.
14. Breast Cancer Treatment | Treatment Options for Breast Cancer | American Cancer Society <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment.html>.
15. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22153890/>.
16. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32147701/>.
17. Pathologic Complete Response and Its Impact on Breast Cancer Recurrence and Patient's Survival after Neoadjuvant Therapy: A Comprehensive Meta-Analysis - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35003324/>.
18. Immunoterapia + chemioterapia nel setting neoadiuvante, quali dati nel tumore della mammella ER+/HER2-? - OncolInfo <https://oncinfo.it/congressi/immunoterapia-chemioterapia-nel-setting-neoadiuvante-quali-dati-nel-tumore-della-mammella-er-her2/>.
19. Asaoka, M., Gandhi, S., Ishikawa, T., and Takabe, K. (2020). Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer: Past, Present, and Future. *Breast Cancer (Auckl)* *14*, 1178223420980377. <https://doi.org/10.1177/1178223420980377>.
20. Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J.P., and Gögenur, I. (2021). Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer* *124*, 359–367. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01048-4>.
21. Nguyen, Q.P., Deng, T.Z., Witherden, D.A., and Goldrath, A.W. (2019). Origins of CD4+ circulating and tissue-resident memory T-cells. *Immunology* *157*, 3–12. <https://doi.org/10.1111/imm.13059>.
22. Mueller, S.N., and Mackay, L.K. (2016). Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat Rev Immunol* *16*, 79–89. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.3>.
23. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33262144/>.

24. Lu, Y., Ruan, Y., Hong, P., Rui, K., Liu, Q., Wang, S., and Cui, D. (2023). T-cell senescence: A crucial player in autoimmune diseases. *Clin Immunol* 248, 109202. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2022.109202>.
25. Senescence and cancer — role and therapeutic opportunities | Nature Reviews Clinical Oncology <https://www.nature.com/articles/s41571-022-00668-4>.
26. Marin, I., Boix, O., Garcia-Garijo, A., Sirois, I., Caballe, A., Zarzuela, E., Ruano, I., Attolini, C.S.-O., Prats, N., López-Domínguez, J.A., et al. (2023). Cellular Senescence Is Immunogenic and Promotes Antitumor Immunity. *Cancer Discov* 13, 410–431. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-22-0523>.
27. Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat Immunol* 12, 492–499. <https://doi.org/10.1038/ni.2035>.
28. Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 15, 486–499. <https://doi.org/10.1038/nri3862>.
29. Baessler, A., and Vignali, D.A.A. (2024). T Cell Exhaustion. *Annu Rev Immunol* 42, 179–206. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-090222-110914>.
30. Budny, A., Starosławska, E., Budny, B., Wójcik, R., Hys, M., Kozłowski, P., Budny, W., Brodzik, A., and Burdan, F. (2019). [Epidemiology and diagnosis of breast cancer]. *Pol Merkur Lekarski* 46, 195–204.
31. Tesi, R.J. (2019). MDSC; the Most Important Cell You Have Never Heard Of. *Trends Pharmacol Sci* 40, 4–7. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.10.008>.
32. Vanhaver, C., van der Bruggen, P., and Bruger, A.M. (2021). MDSC in Mice and Men: Mechanisms of Immunosuppression in Cancer. *J Clin Med* 10, 2872. <https://doi.org/10.3390/jcm10132872>.
33. Groth, C., Hu, X., Weber, R., Fleming, V., Altevogt, P., Utikal, J., and Umansky, V. (2019). Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. *Br J Cancer* 120, 16–25. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0333-1>.
34. Geiger, R., Rieckmann, J.C., Wolf, T., Basso, C., Feng, Y., Fuhrer, T., Kogadeeva, M., Picotti, P., Meissner, F., Mann, M., et al. (2016). L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell* 167, 829–842.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.031>.
35. Bove, M., and Refoni, P. LA CITOMETRIA A FLUSSO.

36. Roederer, M. (2001). Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* *45*, 194–205. [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20011101\)45:3<194::aid-cyto1163>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20011101)45:3<194::aid-cyto1163>3.0.co;2-c).
37. Labtestsonline - Citofluorimetria  
<https://www.labtestsonline.it/approfondimenti/citofluorimetria.html>.
38. Ramello, M.C., Núñez, N.G., Tosello Boari, J., Bossio, S.N., Canale, F.P., Abrate, C., Ponce, N., Del Castillo, A., Ledesma, M., Viel, S., et al. (2021). Polyfunctional KLRG-1+CD57+ Senescent CD4+ T Cells Infiltrate Tumors and Are Expanded in Peripheral Blood From Breast Cancer Patients. *Front Immunol* *12*, 713132. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.713132>.
39. de Paula, B., Kieran, R., Koh, S.S.Y., Crocamo, S., Abdelhay, E., and Muñoz-Espín, D. (2023). Targeting Senescence as a Therapeutic Opportunity for Triple-Negative Breast Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* *22*, 583–598. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-22-0643>.
40. Chakrabarty, A., Chakraborty, S., Bhattacharya, R., and Chowdhury, G. (2021). Senescence-Induced Chemoresistance in Triple Negative Breast Cancer and Evolution-Based Treatment Strategies. *Front Oncol* *11*, 674354. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.674354>.
41. Lin, N.U., Vanderplas, A., Hughes, M.E., Theriault, R.L., Edge, S.B., Wong, Y.-N., Blayney, D.W., Niland, J.C., Winer, E.P., and Weeks, J.C. (2012). Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer* *118*, 5463–5472. <https://doi.org/10.1002/cncr.27581>.
42. Huang, Y., Ma, C., Zhang, Q., Ye, J., Wang, F., Zhang, Y., Hunborg, P., Varvares, M.A., Hoft, D.F., Hsueh, E.C., et al. (2015). CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget* *6*, 17462–17478.
43. Wang, Q., Shao, X., Zhang, Y., Zhu, M., Wang, F.X.C., Mu, J., Li, J., Yao, H., and Chen, K. (2023). Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy. *Cancer Med* *12*, 11149–11165. <https://doi.org/10.1002/cam4.5698>.

44. Chow, A., Perica, K., Klebanoff, C.A., and Wolchok, J.D. (2022). Clinical implications of T cell exhaustion for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* *19*, 775–790. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00689-z>.
45. Giles, J.R., Globig, A.-M., Kaech, S.M., and Wherry, E.J. (2023). CD8+ T cells in the cancer-immunity cycle. *Immunity* *56*, 2231–2253. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.09.005>.
46. Mazziotta, F., Biavati, L., Mukhopadhyay, R., Knaus, H.A., Borrello, I.M., Gojo, I., and Luznik, L. (2021). Bone Marrow GZMK +IL7R + Progenitor-Exhausted CD8 + T Cells Correlate with Sustained Clinical Remission in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) Undergoing Chemotherapy. *Blood* *138*, 521. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-149150>.
47. Rodríguez, I.J., Bernal-Estévez, D.A., Llano-León, M., Bonilla, C.E., and Parral-López, C.A. (2023). Neoadjuvant chemotherapy modulates exhaustion of T cells in breast cancer patients. *PLoS One* *18*, e0280851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280851>.
48. Expression of therapy-induced senescence markers in breast cancer samples upon incomplete response to neoadjuvant chemotherapy - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33948615/>.
49. Markowitz, J., Wesolowski, R., Papenfuss, T., Brooks, T.R., and Carson, W.E. (2013). Myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* *140*, 13–21. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2618-7>.
50. Liu, H., Wang, Z., Zhou, Y., and Yang, Y. (2023). MDSCs in breast cancer: an important enabler of tumor progression and an emerging therapeutic target. *Front. Immunol.* *14*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1199273>.
51. Ai, L., Mu, S., Wang, Y., Wang, H., Cai, L., Li, W., and Hu, Y. (2018). Prognostic role of myeloid-derived suppressor cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* *18*, 1220. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5086-y>.
52. MacDonald, C., Ministero, S., Pandey, M., Robinson, D., Forti Hong, E., Hylander, B., McCarthy, P., Gordon, C., Repasky, E., and Mohammadpour, H. (2021). Comparing thermal stress reduction strategies that influence MDSC accumulation in tumor bearing mice. *Cell Immunol* *361*, 104285. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104285>.



53. Chesney, J.A., Mitchell, R.A., and Yaddanapudi, K. (2017). Myeloid-derived suppressor cells-a new therapeutic target to overcome resistance to cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 102, 727–740. <https://doi.org/10.1189/jlb.5VMR1116-458RRR>.