UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di scienze ed innovazione tecnologica

Corso di laurea magistrale in Biologia- curriculum biomedico e biomolecolare

TESI DI LAUREA

Approccio molecolare e immunoistochimico per la valutazione prognostico terapeutica nell'adenocarcinoma dell'endometrio

Relatrice: dr.ssa Valeria Magnelli

Correlatore: dr.ssa Paola Re

Candidato: Mattia Zenato

Anno accademico 2025/2026

Ai principi del POSUR,

che non mi hanno mai abbandonato

INDICE

SCOPO DEL PROGETTO 5
1. INTRODUZIONE 6
1.1. Introduzione sul cancro dell'endometrio 6
1.2. Epidemiologia del cancro dell'endometrio 9
1.3. Fattori di rischio del cancro dell'endometrio 11
1.3.1. Obesità 11
1.3.2. Diabete mellito 12
1.3.3. Terapia con tamoxifene 13
1.3.4. Fattori riproduttivi che aumentano la concentrazione di estrogeni non contrastati dal progesterone 14
1.3.5. Sindrome di Lynch 16
1.4. Patogenesi del cancro dell'endometrio 17
1.4.1. Instabilità dei microsatelliti (MSI) e DNA Mismatch repair (MMR) 17
1.5. Diagnosi 19
1.6. Stadiazione 20
1.6.1. Classificazione FIGO 20
1.6.2. Classificazione AJCC 22
1.7. Trattamento del cancro dell'endometrio 24
2. MATERIALI E METODI 26
2.1. Analisi immunoistochimica con il Roche Ventana BenchMark ULTRA 26
2.1.1. Controlli di qualità: controllo positivo e controllo negativo 35
2.1.2. Protocollo 36
2.2. Anticorpi per l'interpretazione dell'instabilità microsatellitare e procedura di immunoistochimica associata 38
2.3. Interpretazione della colorazione 40
2.4. Analisi molecolare dell'instabilità microsatellitare 43
3. RISULTATI 50
3.1. Distribuzione per età 53
3.2. Caratterizzazione istologica dei carcinomi endometriali 54
3.3. Caratterizzazione MSS/MSI mediante IHC 55
3.4. Conferma in biologia molecolare 57
3.5. Confronto tra analisi immunoistochimica e biologia molecolare 58
Caso 1 58

Caso 2 58
Caso 3 59
Caso 4 59
Caso 5 60
4. DISCUSSIONE 62
5. CONCLUSIONI 66
6. BIBLIOGRAFIA 68
7. RINGRAZIAMENTI 71

SCOPO DEL PROGETTO

L'elaborato intende esaminare in maniera sistematica l'impiego di due approcci centrali, ovvero l'immunoistochimica (IHC) e le tecniche di biologia molecolare, nella determinazione dell'instabilità dei microsatelliti (MSI) nei pazienti affetti da tumore dell'endometrio. L'instabilità dei microsatelliti è un importante biomarcatore molecolare, con implicazioni significative sia sul piano prognostico sia nella definizione delle strategie terapeutiche.

Il lavoro trae origine dall'esperienza di tirocinio svolta presso l'Ospedale Universitario IRCCS "SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria, contesto nel quale è stata fatta un'analisi comparativa tra le due metodiche, con l'obiettivo di valutarne il grado di concordanza diagnostica, l'affidabilità e le criticità applicative nella routine clinica.

L'immunoistochimica consente di indagare l'espressione delle proteine coinvolte nel sistema di mismatch repair (MMR) ed è una tecnica di esecuzione abbastanza rapida e sostenibile dal punto di vista economico. Le tecniche di biologia molecolare, che si basano sull'analisi diretta delle sequenze dei microsatelliti, permettono una caratterizzazione più precisa dell'assetto genetico del tumore, a fronte però di una maggiore complessità tecnica e un impiego di risorse sia economiche che professionali più rilevanti.

Lo scopo principale di questa tesi è valutare in quale misura tali approcci possano essere considerati alternativi o, più appropriatamente, complementari nel percorso diagnostico-terapeutico del carcinoma endometriale, con particolare attenzione all'identificazione dei soggetti affetti da sindrome di Lynch.

L'interpretazione dei risultati ottenuti, affiancata da un confronto critico con la letteratura scientifica attuale, intende contribuire alla riflessione sull'ottimizzazione dei percorsi diagnostico-terapeutici in oncologia, nel contesto dei più recenti sviluppi della medicina di precisione.

1. INTRODUZIONE

1.1.Introduzione sul cancro dell'endometrio

L'epitelio ghiandolare e stromale del tessuto endometriale costituisce la porzione più interna della cavità uterina e svolge un ruolo fondamentale nel ciclo mestruale e nella capacità riproduttiva della donna. Tale tessuto, sotto l'influsso degli steroidi gonadici, in particolare degli estrogeni e del progesterone, va incontro a una dinamica ciclica che comprende proliferazione, secrezione e desquamazione nella donna in età fertile. Alterazioni di questi processi regolativi, specialmente in presenza di esposizione prolungata a stimoli estrogenici "non bilanciati", possono predisporre a iperplasia endometriale e, in alcuni casi, all'evoluzione verso una trasformazione maligna.(Kuhn et al. 2023).

A livello mondiale, il cancro dell'endometrio (CE) è al settimo posto tra tutti i tumori femminili, con la maggior parte dei casi che si verifica tra i 65 e i 75 anni d'età principalmente in donne che vivono in Paesi occidentali sviluppati (Makker et al. 2021).

I fattori di rischio più comuni associati all'insorgenza della malattia sono l'obesità, il fumo , l'ipertensione e malattie associate a livelli elevati di estrogeni (Kopatsaris et al. 2024).

Esistono anche fattori genetici che possono aumentare il rischio di carcinoma dell'endometrio, in particolare la sindrome di Lynch, sindrome autosomica dominante caratterizzata da una mutazione germinale in uno dei geni del sistema di riparazione del DNA (MMR o mismatch repair) che sono cruciali per mantenere la stabilità genica. Questo difetto porta molto spesso ad instabilità dei microsatelliti (MSI). Circa il 3% dei carcinomi endometriali è dovuto alla sindrome di Lynch (Makker et al. 2021).

Dal punto di vista istopatologico classico, la malattia è suddivisa in due tipi sulla base del modello proposto Bokhman V.P nel 1983: il tipo I è il più comune ed è caratterizzato da un'insorgenza legata a condizioni di iperestrogenismo e il tipo II non dipendente dagli estrogeni e più aggressivo (Buhtoiarova et al. 2016).

La Federazione Internazionale di Ginecologia e Ostetricia (FIGO) classifica il cancro all'endometrio in tre gradi in base alle caratteristiche microscopiche ghiandolari (Mahdy et al. 2025):

- Grado 1: crescita solida non ghiandolare ≤5%
- Grado 2: crescita solida non ghiandolare dal 6% al 50%
- Grado 3: crescita solida non ghiandolare >50%

I tumori G1 tendono a limitarsi all'endometrio mentre quelli G3 hanno una maggiore percentuale di invasione miometriale consentendo di prevedere anche un possibile coinvolgimento linfonodale e la comparsa di metastasi indipendentemente dalla differenziazione della neoplasia.

I principali fattori di rischio per la comparsa di metastasi a distanza sono il grado istologico, il grado di invasione miometriale, l'invasione degli spazi linfatici e vascolari, l'interessamento cervicale, la diffusione extrauterina e il tipo istologico. Le sedi di più frequente localizzazione delle metastasi sono polmone, fegato, ossa (soprattutto vertebre) e cervello.

Esistono diverse varianti di cancro dell'endometrio sulla base delle caratteristiche istologiche:

- Adenocarcinoma endometrioide: rappresenta circa l'85% dei tumori dell'endometrio; i carcinomi endometrioidi di basse grado (G1 e G2) sono i più comuni e spesso sono associati ad un esito favorevole. Invece, il carcinoma endometrioide di grado 3 è caratterizzato da un modello di crescita solida con atipia nucleare moderata e aumento del numero di mitosi (Soslow et al. 2007)
- Adenocarcinoma sieroso-papillare: istotipo raro, rappresenta circa il 5-10% dei carcinomi dell'endometrio. Presenta invasione miometriale, invasione vascolare e spesso si presenta ad uno stadio avanzato, con metastasi ai linfonodi pelvici e para-aortici. Ha una prognosi peggiore rispetto alla forma endometrioide, con recidive che si verificano in circa il 50% dei carcinomi sierosi (Cirisano et al. 2000).
- Adenocarcinoma a cellule chiare: è un tumore tipico dell'età avanzata, è molto raro perché rappresenta circa l'1% dei carcinomi dell'endometrio. È un gruppo eterogeneo perché condivide caratteristiche considerate tipiche e altre simili al carcinoma sieroso. Il carcinoma a cellule chiare dell'endometrio ha gli stessi caratteri istologici architetturali del carcinoma a cellule chiare di altre sedi genitali. Ha una prognosi sfavorevole (Cirisano et al. 2000).
- Carcinoma indifferenziato: tumore composto da masse solide di cellule indifferenziate. La mancanza di un insieme definito di caratteristiche morfologiche porta spesso a diagnosi errate di questo tumore rispetto ai più comuni (Tafe et al. 2010).
- Tumori misti: i carcinomi misti sono composti da due o più tipi istologici distinti di carcinoma endometriale, dei quali almeno uno è sieroso o a cellule chiare. La diagnosi di tumore misto dovrebbe essere effettuata solo quando entrambe le componenti presentano una morfologia e un immunofenotipo caratteristico (Rabban et al. 2019).
- Carcinosarcoma: tumore che mostra un pattern bifasico, caratterizzato da una componente carcinomatosa che solitamente è di tipo sieroso, endometrioide o misto di alto grado e una componente sarcomatosa che può essere di differenziazione uterina o verso linee mesenchimali non tipiche dell'utero come cartilagine, osso, muscolo scheletrico o adipociti (Rabban et al. 2019)

Più recentemente, l'approccio è evoluto verso una classificazione molecolare come quella proposta dal The Cancer Genome Atlas (TCGA) per il carcinoma dell'endometrio che individua 4 sottogruppi (Mahdy et al. 2025):

- POLE-ultramutato: mutazione degli esoni 9-14 del dominio esonucleasico di POLE 58, subunità ε della DNA polimerasi (Kommoss et al. 2018) con alterazioni del numero di copie somatiche molto basso (Oaknin et al. 2022). Hanno una prognosi eccellente.
- dMMR (deficient Mismatch repair): perdita completa dell'espressione di una o più proteine del sistema di riparazione del DNA (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) che porta ad instabilità dei microsatelliti (MSI) con alterazioni del numero di copie somatiche molto basso. È associato alla sindrome di Lynch. Hanno una prognosi intermedia.(Oaknin et al. 2022)
- p53 aberrante (p5-abn): p53 è una proteina che normalmente controlla i danni al DNA e lo stress cellulare. Quando il gene che codifica per p53 (TP53) è mutato, la proteina perde la sua funzione. Tumori con p53 mutato hanno un'alterazione del numero di copie somatiche molto alto e sono associati ad una prognosi sfavorevole. La maggior parte dei carcinomi sierosi e una parte significativa dei carcinosarcomi presenta questa mutazione (Oaknin et al. 2022).
- NSMP (no specific molecular profile): tumori caratterizzati dall'assenza delle mutazioni elencate precedentemente negli altri sottogruppi. Prognosi intermedia (Oaknin et al. 2022).

Istotipo	**Percentuale**
Adenocarcinoma endometrioide POLE-ultramutated Mismatch repair-deficient P53-mutato No specific molecular profile (NSMP)	85%
Adenocarcinoma sieroso-papillare	<10%
Adenocarcinoma a cellule chiare	2%
Carcinosarcoma	<2%
Adenocarcinoma misto	3%
Adenocarcinoma indifferenziato	2%

Figure 1 Istotipi e frequenza del carcinoma endometriale

1.2. Epidemiologia del cancro dell'endometrio

Nel 2020 la CE è stata diagnosticata in 417.367 donne in tutto il mondo, con Nord America ed Europa occidentale le zone più colpite a causa di un'elevata presenza di fattori di rischio legati allo stile di vita come l'obesità, che è associata a circa il 50% dei casi di CE. L'incidenza del cancro dell'endometrio è in aumento.

Sulla base di un'analisi epidemiologica del 2016, che ha studiato molteplici casi dal 1971 al 2014, la mortalità della CE è aumentata in media dell'1,9% all'anno. Negli Stati Uniti si stima che entro il 2030 il numero di donne a cui verrà diagnosticato un cancro dell'endometrio raddoppierà, arrivando a 122.000 casi all'anno.

Dal 2020 il cancro uterino è la quarta neoplasia femminile più comune in Europa, con un'incidenza di 12,9-20,2 ogni 100.000 donne e con una mortalità di 2,0-3,7 ogni 100.000 donne.

Le disparità geografiche, socioeconomiche e razziali influenzano l'incidenza e la mortalità del cancro dell'endometrio. Per quanto riguarda il fattore geografico si è visto che paesi sviluppati con un'assistenza sanitaria di alta qualità e la densità elevata di oncologi riduce l'incidenza e la mortalità rispetto a paesi in via di sviluppo.

Anche lo status socioeconomico (o SES, che valuta reddito, classe sociale e livello di istruzione degli individui) influenza notevolmente l'insorgere della malattia e il possibile esito finale; infatti, in uno studio svedese, è emerso che le donne con SES più elevato hanno meno probabilità di presentare CE avanzata e generalmente hanno un esito più favorevole legato ad un accesso migliore all'assistenza sanitaria rispetto alle donne con SES più basso, dove diagnosi in fase avanzata e una ridotta sopravvivenza sono più frequenti.

Inoltre, le donne nere con SES più basso hanno il doppio della probabilità di ricevere un trattamento ritardato e 2,5 volte la probabilità di morire di CE a causa della mancanza di assicurazione sanitaria.

Studi negli Stati Uniti dimostrano che nelle donne nere vengono diagnosticati sottotipi istologici più sfavorevoli e uno stadio e un grado di CE più elevati rispetto alle donne bianche. In generale le donne nere hanno esiti peggiori in ogni stadio, grado e tipo istologico di cancro dell'endometrio e meno probabilità di ricevere la terapia corretta, sia che sia di natura farmacologica (chemioterapia) o chirurgica (isterectomia). Anche il fattore genetico ha un ruolo importante nella prognosi e nell'esito della malattia (Makker et al. 2021).

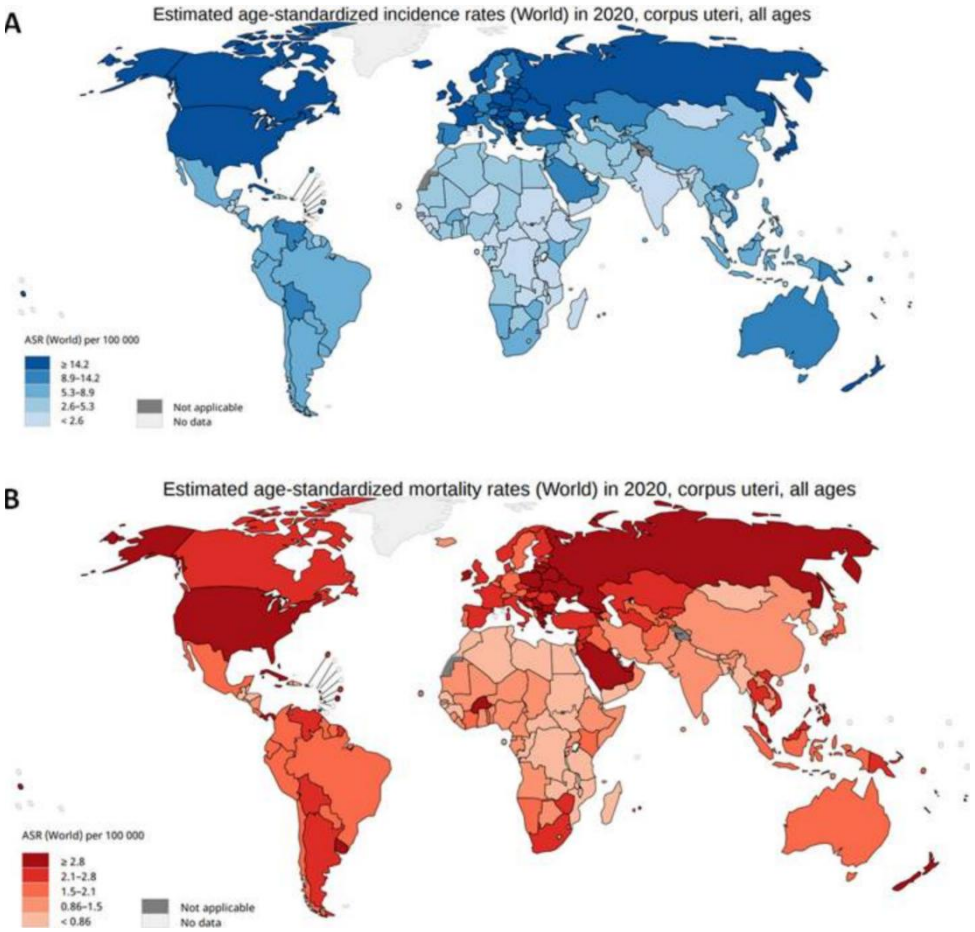

Figure 2 Incidenza (figura A) e mortalità (figura B) del cancro dell'utero

In Italia, il carcinoma dell'endometrio rappresenta il terzo tumore per frequenza nelle donne della fascia d'età 50-69 anni e rappresenta il 5,5% di tutti i tumori diagnosticati, con 10.200 nuovi casi diagnosticati all'anno e una sopravvivenza del 79% a 5 anni dalla diagnosi (AIOM-AIRTUM,2023).

1.3.Fattori di rischio del cancro dell'endometrio

1.3.1. Obesità

L'obesità è uno dei fattori di rischio più associati all'insorgenza del cancro dell'endometrio rispetto a qualsiasi altro tipo di cancro. Si stima infatti che circa il 57% dei tumori all'endometrio negli Stati Uniti è attribuibile al sovrappeso. Questa relazione tra obesità e cancro dell'endometrio segue una relazione dose-risposta, con l'incidenza del cancro che aumenta con l'aumentare dell'indice di massa corporea (BMI). Il sottotipo istologico più correlato all'obesità è l'adenocarcinoma endometrioide, anche se recentemente è stato scoperto che l'incidenza di altri istotipi più aggressivi come l'adenocarcinoma sieroso o a cellule chiare aumenta all'aumentare del BMI. L'obesità ovviamente aggrava il quadro generale della malattia; infatti, in uno studio retrospettivo su donne con cancro dell'endometrio in fase iniziale, le donne gravemente obese hanno tassi di mortalità più correlate all'obesità.

Il tessuto adiposo è un organo endocrino complesso, composto da adipociti e preadipociti, nonché da macrofagi infiltranti, cellule stromali, nervose e staminali. Il tessuto adiposo secerne una serie di citochine, chiamate adipochine, che esercitano effetti locali e sistemici, che aumentano la proliferazione endometriale e promuovono la cancerogenesi. In particolare, viene prodotta l'aromatasi, un enzima che converte gli androgeni in estrogeni, promuovendo direttamente la proliferazione endometriale. Questo enzima è molto attivo nelle donne in menopausa, dove il tessuto adiposo diventa il principale organo di produzione degli estrogeni, ed è influenzato dall'età e dall'indice di massa corporea. Inoltre, con l'aumento della BMI diminuiscono le globuline leganti gli ormoni sessuali (SHBG) responsabili dell'inattivazione biologica degli ormoni sessuali, aumentando così il pool disponibile di estrogeni bioattivi, anche senza sintesi de novo di questi.

Una volta legato al suo recettore (α e/o β) l'estrogeno modula la trascrizione di una serie di geni che stimolano la proliferazione, tra cui IGF1 (Insulin-like growth factor) e IGF1R (Insulin-like growth factor receptor). La proliferazione endometriale è attivata, mediante il recettore per l'estrogeno, grazie all'attivazione delle vie di segnalazione MAPK e Akt.

Gli estrogeni non stimolano solo la mitosi, ma sono anche mutageni, poiché i suoi metaboliti genotossici reagiscono con il DNA portando a rotture del doppio filamento e contribuendo all'instabilità genetica.

Come già citato precedentemente, il tessuto adiposo produce una serie di polipeptidi noti come adipochine, che regolano il metabolismo e modulano lo stato di infiammazione cronica associato all'obesità. In particolare, vengono prodotte adipochine proinfiammatorie come la leptina,

l'interleuchina-6 e il fattore di necrosi tumorale α, che inibiscono il normale signaling dell'insulina generando anche insulino-resistenza e promuovendo la proliferazione endometriale.

Inoltre, l'infiammazione cronica induce stress cellulare con produzione di specie reattive dell'ossigeno che possono ossidare varie componenti cellulari, portando anche a danno del DNA e conseguente instabilità genica. In questo contesto, l'endometrio con deficit della riparazione del DNA (dMMR) accumulano mutazioni genetiche deleterie, che portano prima ad iperplasia endometriale e successivamente a cancro (Onstad et al. 2016).

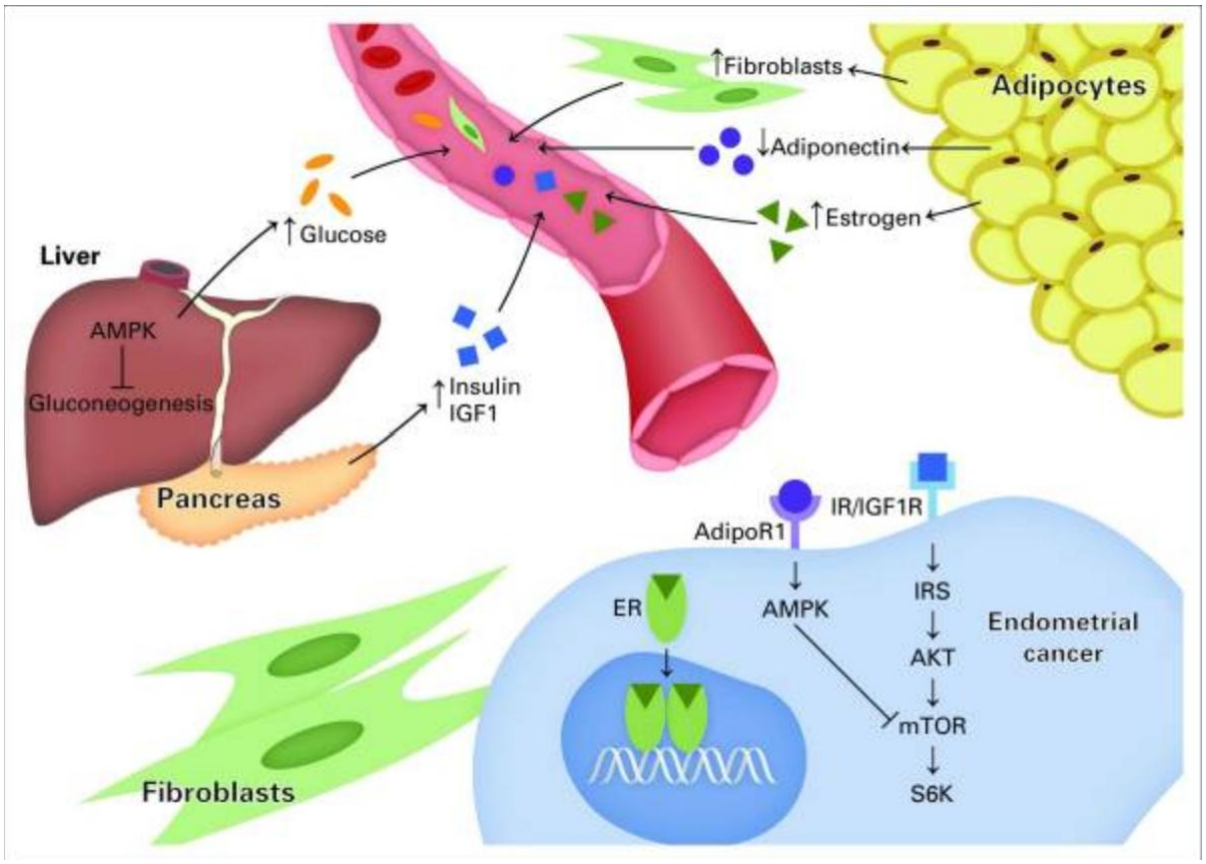

Figure 3 Effetti dell'obesità sulla proliferazione endometriale e sulla cancerogenesi

1.3.2. Diabete mellito

Il diabete mellito, in particolare il tipo II, è caratterizzato da elevati livelli di insulina, di IGF1 e di iperglicemia, che svolgono tutti un ruolo fondamentale nella patogenesi del cancro dell'endometrio. Nell'iperplasia endometriale, infatti, si osserva un aumento dell'espressione dei recettori dell'insulina e dell'IGF1, contribuendo ad aumentare la risposta all'insulina di queste cellule promuovendo anche l'iperattività della via di segnalazione MAPK e PI3K/Akt/mTOR, che sono associati all'iperproliferazione tumorale.

Inoltre, la segnalazione proliferativa è ulteriormente amplificata dalla perdita del gene oncosoppressore PTEN, che ha azione opposta rispetto alla via PI3K/Akt/mTOR ed è un evento precoce della patogenesi del cancro dell'endometrio.
Infine, l'iperglicemia, che è una conseguenza dell'insensibilità all'insulina, contribuisce ad alimentare la crescita di tessuto metabolicamente attivo, portando ad esempio ad iperplasia ed eventualmente a cancro dell'endometrio (Onstad et al. 2016).
Tuttavia, la relazione tra diabete e cancro dell'endometrio è in gran parte influenzata dal peso corporeo, restando un modesto fattore di rischio indipendente (Luo et al. 2014).

1.3.3. Terapia con tamoxifene

Il tamoxifene è un trattamento molto utilizzato per donne sia in premenopausa che in postmenopausa con carcinoma mammario positivo al recettore degli estrogeni-α (che rappresentano circa il 70% dei carcinomi mammari). Questo farmaco ha notevolmente ridotto la mortalità ed il rischio di recidiva delle pazienti con cancro alla mammella.
Sebbene il tamoxifene sia molto efficace per il cancro al seno, ha effetti collaterali molto gravi. Uno dei più significativi e dannosi del trattamento in donne in menopausa è la sua capacità di aumentare notevolmente la probabilità di sviluppare un cancro dell'endometrio (l'aumento del rischio varia da 1,5 a 6,9 volte). Il rischio non è associato al dosaggio giornaliero del farmaco, ma alla sua esposizione duratura nel tempo e all'uso cumulativo. La probabilità di sviluppare un cancro dell'endometrio nelle pazienti che prendono questo farmaco aumenta significativamente con l'aumento del peso corporeo.
Inizialmente, i tumori dell'endometrio indotti dall'esposizione al tamoxifene erano considerati con una buona prognosi, tuttavia studi più recenti hanno dimostrato che questi tumori hanno una prognosi sfavorevole, data l'insorgenza di sottotipi morfologici più insidiosi, e quindi una mortalità più elevata.
Il tamoxifene aumenta l'attivazione, nell'endometrio, di una serie di vie di segnalazione che promuovono la proliferazione cellulare come ad esempio MAPK, c-MYC e IGF1 infatti l'indice di apoptosi/proliferazione, determinato misurando il marcatore di proliferazione Ki67 e i marcatori di apoptosi/anti-apoptosi, è più alto nelle lesioni endometriali delle pazienti che hanno utilizzato tamoxifene rispetto a quelle che non l'hanno utilizzato.
Oltre alla proliferazione cellulare, il tamoxifene promuove il rimodellamento del citoscheletro e la migrazione delle cellule del cancro dell'endometrio.
Nel cancro al seno, il tamoxifene agisce come antagonista del recettore dell'estrogeno competendo con esso per il legame e inducendo cambiamenti conformazionali che bloccano l'interazione del recettore dell'estrogeno con le proteine co-attivatrici. Nel tessuto endometriale, invece il tamoxifene esercita un'azione contraria andando a reclutare co-attivatori, promuovendo quindi effetti estrogenici

che aumentano la proliferazione cellulare. Infine il tamoxifene influenza l'attività trascrizionale di ERα e ne regola i livelli di espressione nell'endometrio (Hu et al. 2015).

1.3.4. Fattori riproduttivi che aumentano la concentrazione di estrogeni non contrastati dal progesterone

Nelle donne sane, l'endometrio subisce un cambiamento ciclico del suo spessore modulato dagli ormoni sessuali, ovvero estrogeni e progesterone, dove l'estrogeno, come già citato, stimola la proliferazione e la differenziazione cellulare mentre il progesterone contrasta questo effetto diminuendo la concentrazione dei recettori per gli estrogeni e favorendo i cambiamenti secretori necessari per l'impianto dell'ovulo fecondato. Quindi qualsiasi fattore che porta ad un aumento dei livelli di estrogeni associati alla carenza di progesterone contribuisce all'aumento di probabilità di insorgenza di un cancro dell'endometrio. In particolare, i fattori riproduttivi svolgono un ruolo fondamentale nell'eziologia del cancro dell'endometrio.

L'età del menarca e della menopausa sono i fattori di rischio più studiati in questo ambito in relazione al cancro dell'endometrio, perché un'età del menarca più giovane e un'età più avanzata della menopausa sono associate ad un aumento di rischio di CE, poiché un'età più giovane di insorgenza del primo ciclo mestruale è legata ad una più precoce esposizione agli estrogeni e se accompagnata da un'età più avanzata della menopausa rende il periodo di esposizione agli estrogeni più lungo a causa dell'aumento del numero di cicli mestruali.

L'infertilità è un altro fattore associato all'insorgenza di CE, esponendo la donna alla malattia in età più giovane.

L'ovulazione poco frequente o in casi più gravi l'anovulazione cronica portano ad un aumento della produzione di estrogeni ed una diminuzione della produzione di progesterone. Sebbene questo porti, alla fine del ciclo mestruale, lo sfaldamento dell'endometrio, la sua assenza può portare ad iperplasia endometriale, condizione che porta all'ispessimento progressivo dell'endometrio (considerata infatti una lesione precancerosa), che se non trattata può evolvere in cancro (Ali 2014).

Un ulteriore fattore riproduttivo correlato al cancro dell'endometrio è la sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), un disturbo causato da uno squilibrio degli ormoni sessuali femminili che porta alla formazione di cisti nei follicoli ovarici contenenti acqua e l'ovulo, che quindi non è più disponibile per l'ovulazione, che siccome è bloccata provoca l'interruzione del ciclo mestruale causando amenorrea (Patel 2018).

Nelle pazienti con PCOS l'anovoluzione cronica dovuta alla malattia e il rilascio di estrogeni non contrastati favorisce lo sviluppo e la crescita del cancro dell'endometrio; infatti, le donne con PCOS hanno un rischio tre volte maggiore di sviluppare la malattia. Inoltre, la PCOS causerà insulino-

resistenza nell'ovaio che provocherà iperinsulinemia, che a sua volta può portare ad un'eccessiva secrezione di androgeni e ormone luteinizzante, che sono fattori di rischio per il cancro dell'endometrio. Quasi un terzo dei casi di cancro dell'endometrio è in donne con PCOS.

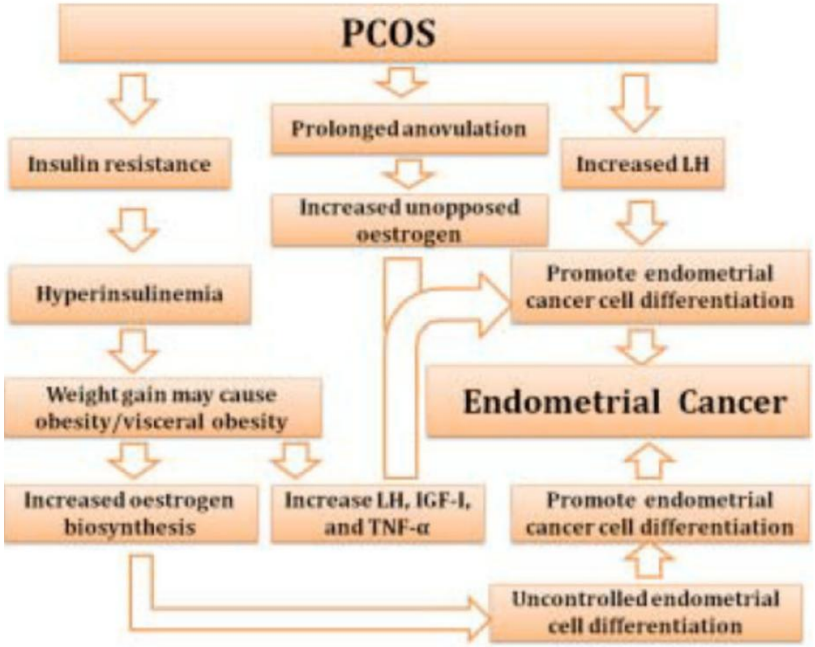

Figure 4 Ruolo della PCOS nella patogenesi del cancro dell'endometrio

È noto che la nulliparità, ovvero la condizione della donna che non ha mai partorito, è associata a rischio di cancro dell'endometrio 2-3 volte maggiore rispetto alle donne che hanno avuto una gravidanza. Questo perché le donne nullipare hanno un maggior numero di cicli mestruali, che determina quindi una maggiore esposizione agli estrogeni (Ali 2014).

1.3.5. Sindrome di Lynch

La sindrome di Lynch (LS) è una patologia autosomica dominante causata da mutazione dei geni del sistema di riparazione dei disallineamenti del DNA (MMR- mismatch repair). Il sistema MMR mantiene la stabilità del genoma riparando tutti gli errori di appaiamento che si generano durante la replicazione del DNA, portando ad alterazioni nella lunghezza delle sequenze dei microsatelliti (MSI, ovvero instabilità dei microsatelliti), aumentando la suscettibilità allo sviluppo di tumori.
La sindrome di Lynch viene suddivisa in due tipi a seconda della localizzazione del tumore:

- Tipo I, che indica esclusivamente i tumori del colon e del retto
- Tipo II, che indica i tumori extraintestinali, come ad esempio il carcinoma endometriale, il carcinoma ovarico, i tumori della mammella, delle vie urinarie e del cervello

Il carcinoma endometriale, in particolare l'istotipo carcinoma endometrioide, associata a sindrome di Lynch è il tumore extraintestinale più comune della sindrome.
La probabilità che una donna con LS sviluppi un carcinoma endometrioide come prima neoplasia è del 40-60%. Questo tumore è considerato un tumore sentinella perché aumenta il rischio di sviluppare altri tumori legati alla sindrome di Lynch.
Le mutazioni del sistema MMR che causano la sindrome di Lynch riguardano in particolare i geni che codificano per le proteine MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. Queste proteine lavorano in eterodimeri associandosi tra loro, in particolare MLH1-PMS2 e MSH2-MSH6.
MSH2 è il gene più frequentemente mutato nelle pazienti LS-EC (48%), ma mutazioni di MLH1 presentano un rischio maggiore di sviluppare il cancro entro i 70 anni di età.
Le mutazioni in MSH6 hanno un pattern particolare, perché hanno un rischio molto elevato di sviluppare un carcinoma endometrioide (circa 26 volte maggiore) e un'età di insorgenza tra i 50 e i 60 anni d'età.
Nonostante sia noto che l'obesità è uno dei fattori di rischio più importanti per lo sviluppo della malattia, le donne con LS-EC hanno un indice di massa corporea più basso rispetto agli altri casi di carcinoma endometriale.
Il carcinoma endometriale associato alla sindrome di Lynch ha una maggiore tendenza a coinvolgere il segmento uterino inferiore, portando ad un maggiore rischio di metastasi linfonodale ed una prognosi peggiore (Zhao et al. 2022).

1.4. Patogenesi del cancro dell'endometrio

Il cancro dell'endometrio si sviluppa a partire da una lesione precursore definita iperplasia endometriale atipica, caratterizza da un iperproliferazione delle cellule endometriali, spesso dovuta a mutazioni somatiche di PTEN; la perdita di PTEN è necessaria per lo sviluppo dell'iperplasia ma non è sufficiente per la progressione verso il carcinoma invasivo.
La patogenesi del cancro dell'endometrio è caratterizzata dai fattori di rischio precedentemente analizzati nel paragrafo 1.3 e delle mutazioni che caratterizzano la progressione della lesione benigna in lesione maligna (Makker et al. 2021).
Una buona parte delle lesioni maligne dell'endometrio (circa il 25-30%) è caratterizzata da mutazioni dei geni che codificano per il sistema di riparazione del DNA e da instabilità dei microsatelliti (Oaknin et al. 2022).

1.4.1. Instabilità dei microsatelliti (MSI) e DNA Mismatch repair (MMR)

I microsatelliti (MS), chiamati anche short tandem repeats (STR), sono brevi sequenze ripetute composte da 1-6 nucleotidi che si trovano principalmente vicino alle regioni codificanti oppure anche negli introni. I microsatelliti sono composti da due zone: un nucleo centrale e i fianchi periferici. La specificità è data dal numero di unità ripetute nel nucleo.
I microsatelliti generalmente si generano per lo slittamento del DNA durante la replicazione o un disallineamento tra i filamenti durante la replicazione o la riparazione del DNA, che porta alla perdita o all'aggiunta di una o più sequenze ripetute. Il normale sistema di riparazione del DNA, o DNA mismatch repair, può correggere eventuali errori nel processo di replicazione del DNA (Li et al. 2020).
Il sistema MMR è un meccanismo altamente conservato per ripristinare l'integrità del DNA dopo errori; di particolare importanza sono quattro geni che codificano per le proteine omonime: MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. Queste proteine sono attive grazie alla formazione di eterodimeri, MLH1 si associa a PMS2 e MSH2 a MSH6. L'inattivazione di questi geni, dovuta a mutazioni germinali o somatiche o silenziamento epigenetico, si traduce in un meccanismo MMR difettoso (dMMR).
MLH1 e MSH2 sono partner obbligatori degli eterodimeri, in quanto una loro mutazione porta ad una degradazione proteolitica della proteina mutata e del suo partner secondario, rispettivamente PMS2 e MSH6. Al contrario, mutazione di PMS2 e MSH6 non portano alla degradazione proteolica del suo partner primario, perché sono in grado di formare eterodimeri con altre proteine del MMR.
L'instabilità dei microsatelliti (MSI) è una condizione di ipermutabilità genetica risultante da un difetto del sistema MMR. È caratterizzata da una serie di mutazioni nei microsatelliti che in genere

consistono in alterazioni della lunghezza delle ripetizioni. Pertanto, l'MSI è un marcatore fenotipico che rappresenta un deficit del sistema MMR (Luchini et al. 2019).
Il fenotipo MSI è correlato alla sindrome di Lynch, malattia genetica caratterizzata da mutazioni germinali ereditarie nei geni MMR, che si manifestano principalmente nel cancro del colon-retto e nel cancro dell'endometrio.
L'identificazione di questo fenotipo viene fatta attraverso un'analisi molecolare seguendo le linee guida del pannello Bethesda, che include cinque regioni genomiche predefinite: due a singolo nucleotide (BAT25 e BAT26) e tre dinucleotidi (D2S123, D5S346 e D17S250).
Lo stato dei microsatelliti viene valutato in base al numero di marcatori di instabilità:

- MSI-H, elevata instabilità dei microsatelliti quando più di due loci sono instabili;
- MSI-L, bassa instabilità dei microsatelliti quando è presente un solo locus instabile;
- MSS, stabilità dei microsatelliti quando non sono presenti loci instabili.

Spesso MSI-L e MSS vengono raggruppati nello stesso gruppo, in quanto i tumori hanno caratteristiche molecolari e cliniche simili.
Gli inibitori degli immunocheckpoint hanno dimostrato di essere efficaci in tumori MSI-H rispetto alla chemioterapia (Amato et al. 2022).

1.5.Diagnosi

L'esordio clinico del carcinoma endometriale è rappresentato da un sanguinamento vaginale anomalo, sia esso una perdita ematica vaginale in menopausa o un sanguinamento inatteso rispetto al flusso mestruale normale in età fertile (metrorragia intermestruale). Raramente la malattia ha un decorso asintomatico e la diagnosi viene fatta in maniera accidentale.

Vista l'aumentata incidenza e un'età di insorgenza più bassa del carcinoma endometriale, è necessario sottoporre a controllo clinico strumentale tutte le pazienti in età fertile che presentino una metrorragia intermestruale.

Dolore e leucoxantorrea (perdite vaginali di colore giallastro, dovuto all'abbondanza di leucociti) sono tipici delle fasi più avanzate della malattia e sono dovuti a fenomeni necrotico-colliquativi.

Il primo esame che viene eseguito in una donna che lamenta perdita ematica vaginale anomala è l'ecografia trans vaginale (trans-vaginal sonography, TVS) (Savelli et al. 2008).

Tale esame permette di valutare lo spessore endometriale e l'eventuale presenza di ispessimenti focali. In una donna in postmenopausa lo spessore viene considerato sospetto se maggiore di 5 mm mentre nelle donne fertili lo spessore può variare tra 1 e 14 mm in funzione del periodo del ciclo mestruale. Inoltre possono essere aggiunti nell'ecografia color e power Doppler per valutare con accuratezza la perfusione ematica dell'endometrio e i processi espansivi a suo carico (Epstein et al. 2011).

La diagnosi di carcinoma endometriale si base sulla valutazione del tessuto endometriale ottenuto attraverso prelievi bioptici mirati associati o meno a isteroscopia.

La risonanza magnetica con mezzo di contrasto è in grado di studiare in maniera completa il carcinoma endometriale consentendo di valutare l'invasione miometriale, l'infiltrazione dello stroma della cervice e delle pareti della vagina, oltre che del tessuto adiposo e della presenza di linfoadenomegalie pelviche o lombo-aortiche (Manfredi et al. 2004).

La TC rispetto alla risonanza magnetica ha una scarsa accuratezza diagnostica nella valutazione dell'utero ma è utile per valutare eventuali sedi extrauterine della malattia.

La PET con glucosio marcato (FDG), invece, è molto utile per l'identificazione delle metastasi a distanza (Suga et al. 2011).

1.6. Stadiazione

La stadiazione del tumore dell'endometrio si basa sulla valutazione anatomo-patologica della malattia. Esistono due classificazioni diverse: la stadiazione FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) e la stadiazione AJCC (American Joint Committee on Cancer).

1.6.1. Classificazione FIGO

La stadiazione FIGO del 2009 è stata fino ad oggi quella più largamente utilizzata. Divide la malattia in quattro stadi con alcuni sottogruppi:

- Stadio I: tumore limitato al corpo dell'utero. A sua volta diviso in:
  - IA: nessuna infiltrazione o minore di ½ del miometrio
  - IB: infiltrazione maggiore di ½ del miometrio
- Stadio II: tumore esteso allo stroma cervicale, ma non fuori dall'utero
- Stadio III: estensione locale o regionale
  - IIIA: estensione alla sierosa uterina o alle ovaie
  - IIIB: estensione alla vagina
  - IIIC: estensione ai linfonodi pelvici o lombo-aortici. Distinta ulteriormente in:
    - IIIC1: linfonodi pelvici positivi
    - IIIC2: linfonodi lombo-aortici positivi, indipendentemente dai pelvici
- Stadio IV: estensione alla mucosa vescicale o intestinale o presenza di metastasi a distanza
  - IVA: estensione alla mucosa vescicale o intestinale
  - IVB: presenza di metastasi a distanza

Negli ultimi anni, è stata introdotta la nuova classificazione FIGO 2023 (Berek et al. 2023), che integra alla stadiazione FIGO 2009 con la nuova classificazione molecolare ESGO/ESTRO/ESP 2021 (Concin et al. 2021).

In particolare, sono stati integrati:

1. Istotipo e grado di differenziazione: tumori endometrioidi di basso grado (G1), tumori endometrioidi di alto grado (G3), carcinoma sieroso, carcinoma a cellule chiare, carcinoma misto, carcinoma indifferenziato, carcinosarcoma;
2. Invasione degli spazi linfovascolari (LVSI):
   - Negativa se non interessa nessun vaso
   - Focale se interessa meno di 5 vasi
   - Sostanziale se interessa almeno 5 vasi

3. Maggiore attenzione sulla distinzione tra linfonodi pelvici e lombo-aortici, quindi ponendo più precisione sulla differenza tra coinvolgimento locale e metastatico;
4. Classificazione molecolare:
   - POLE-mutate
   - dMMR, Mismatch repair deficiency
   - abnormal p53
   - NSMP, no specific molecular profile

STADIO I	
IA	IA1 Polipi endometriali o tumori confinati all'endometrio ad istotipo non aggressivo IA2 Coinvolgimento <50% del miometrio, senza o con "focale" LVSI, ad istotipo non aggressivo IA3 Tumore endometriale di basso grado limitato all'utero (<50% del miometrio, LVSI negativa o "focale") e con singola localizzazione ovarica (senza invasione o rottura della capsula)
IB	Tumori con invasione ≥50% del miometrio, senza o con "focale" LVSI, ad istologia non aggressiva
IC	Polipi endometriali o tumori limitati all'endometrio, ad istologia aggressiva
IAmPOLEmut	Tumori POLE mutati confinati all'utero o con estensione cervicale, indipendentemente dall'LVSI, dall'invasione miometriale e dall'istotipo
STADIO II	
IIA	Tumori che invadono lo stroma cervicale, ad istologia non aggressiva
IIB	Tumori con LVSI "sostanziale", ad istotipo non aggressivo
IIC	Tumori con invasione miometriale (< o ≥50%), ad istotipo aggressivo
IICmp53abn	Tumori p53 mutati confinati all'utero o con estensione cervicale, indipendentemente dagli altri fattori prognostici
STADIO III	
IIIA	IIIA1 Interessamento di ovaio e tuba (quando non rispettati i criteri per lo stadio IA3) IIIA2 Interessamento della sottosierosa uterina o diffusione attraverso la sierosa
IIIB	IIIB1 Diffusione diretta o metastasi alla vagina e/o ai parametri IIIB2 Metastasi al peritoneo pelvico (definito dalla linea che unisce le due spine iliache antero-superiori)
IIIC	IIIC1 Tumori con interessamento dei linfonodi pelvici con micrometastasi (IIIC1i) o con macrometastasi (IIIC1ii) IIIC2 Tumori con interessamento dei linfonodi para-aortici fino ai vasi renali, con o senza interessamento dei linfonodi pelvici, con la distinzione tra micrometastasi (IIIC2i) e macrometastasi (IIIC2ii)
STADIO IV	
IVA	Estensione alla mucosa vescicale o intestinale
IVB	Metastasi peritoneali al di fuori della pelvi
IVC	Metastasi a distanza (inclusi i linfonodi extra-addominali o addominali che si trovano al di sopra dei vasi renali)

Figure 5 Stadiazione FIGO 2023

1.6.2. Classificazione AJCC

La stadiazione AJCC è sempre utilizzata nei referti anatomopatologici. Classifica il tumore dell'endometrio sulla base di tre fattori:

- Estensione del tumore (T);
- Coinvolgimento linfonodale (N);
- Presenza di metastasi a distanza (M).

Tx: tumore primitivo non definibile

T0: tumore primitivo non evidenziabile

Tis: carcinoma in situ

T1: tumore limitato al corpo dell'utero

- T1a: tumore confinato all'endometrio o che invade meno della metà del miometrio
- T1b: tumore che invade la metà o più del miometrio

T2: tumore che invade la cervice, ma che non si estende al di fuori dell'utero

T3: diffusione locale e regionale del tumore

- T3a: il tumore invade la sierosa o gli annessi
- T3b: interessamento della vagina

T4: invasione della mucosa vescicale e/o intestinale

Nx: metastasi linfonodali non valutabili

N0: assenza di metastasi nei linfonodi regionali

N1: metastasi ai linfonodi regionali, in questo caso i linfonodi pelvici

- N1mi: metastasi linfonodali regionali ai linfonodi pelvici di diametro compreso tra 0,2 e 2 mm
- N1a: metastasi ai linfonodi pelvici di diametro maggiore di 2 mm

N2: metastasi ai linfonodi para-aortici, con positività o no ai linfonodi pelvici

- N2mi: metastasi ai linfonodi para-aortici di diametro compre tra 0,2 e 2 mm
- N2a: metastasi ai linfonodi para-aortici di diametro maggiore di 2 mm

Mx: mestastasi a distanza non valutabili

M0: assenza di metastasi a distanza

M1: presenza di metastasi a distanza su linfonodi inguinali, intraperitoneo, polmone, fegato o osso. In questa categoria è esclusa la presenza di metastasi regionali precedentemente elencate.

T- Tumore primario	
Tx	Materiale non sufficiente
T0	Non evidenza di malattia
Tis	Carcinoma in situ:tumore piatto
Ta	Non infiltrante la tonaca sottomucosa
T1	Infiltrante la tonaca sottomucosa
T2a	Infiltrante la prima metà della tonaca muscolare
T2b	Infiltrante la seconda metà della tonaca muscolare
T3a	Infiltrazione microscopica del grasso peri-vescicale
T3b	Infiltrazione macroscopica del grasso peri-vescicale
T4a	Infiltrazione organi viciniori: prostata,vescicole seminali utero, vagina
T4b	Infiltrazione parete pelvica e/o addominale
N-Linfonodi	
Nx	Linfonodi non valutabili
N0	Assenza di metastasi nei linfonodi regionali
N1	Metastasi in un singolo linfonodo di una stazione endopelvica (otturatori, iliaci interni, iliaci esterni, presacrali)
N2	Metastasi multiple di stazioni endopelviche
N3	Metastasi multiple di stazioni endopelviche
M- Metastasi a distanza	
Mx	Metastasi a distanza non valtabili
M0	Assenza di metastasi a distanza
M1	Presenza di metastasi a distanza

Figure 6 Stadiazione AJCC

1.7.Trattamento del cancro dell'endometrio

L'approccio tradizionale per il trattamento del cancro dell'endometrio è la combinazione di chirurgia e terapia adiuvante (radioterapia o chemioterapia) nella maggior parte dei casi non metastatici. La decisione sulla terapia adiuvante corretta da utilizzare è basata sui dati clinici e patologici del paziente, inclusi stadio e grado del tumore.

Tuttavia, con l'avvento della classificazione molecolare di questo tumore, è possibile integrare la terapia adiuvante con terapia mirata a seconda del sottotipo molecolare del tumore (Galant et al. 2024).

Nel caso specifico dei tumori dMMR/MSI-H è molto importante l'immunoterapia, in quanto questo tumore presenta un microambiente molto immunogenico, portando ad una maggiore infiltrazione tumorale di linfociti T citotossici che mediano risposte antitumorali. Questo quadro che si viene a creare porta le cellule tumorali ad esprimere recettori dei checkpoint immunitari come PDL-1 e PDL-2 che contribuiscono al processo di immunoescaping, ovvero le cellule tumorali attraverso l'espressione di questi recettori mandano segnali al sistema immunitario di non attaccarle.

L'elevata espressione di questi recettori però rende suscettibili questi tumori agli inibitori dei checkpoint immunitari.

Il primo farmaco di questo tipo ad essere stato approvato è il Pembrolizumab, che blocca l'interazione con PDL-1 e i suoi ligandi impedendo alle cellule tumorali di sfuggire alla sorveglianza immunologica. Questo farmaco è molto utilizzato per tumori solidi e non resecabili con la chirurgia e tumori con un elevato carico mutazionale come quelli MSI-H.

Un altro farmaco inibitore dei checkpoint immunitari approvato è Dostarlimab, che ha avuto risposte efficaci per la cura del carcinoma endometriale dMMR avanzato.

Questo trattamento, usato dopo terapia di prima linea (chemioterapia o radioterapia), ha avuto numerosi benefici per il trattamento dei tumori dMMR/MSI-H (Karpel et al. 2023).

PARTE SPERIMENTALE

2. MATERIALI E METODI

2.1.Analisi immunoistochimica con il Roche Ventana BenchMark ULTRA

Il Roche Ventana BenchMark ULTRA è un sistema automatizzato per l'esecuzione di test immunoistochimici (IHC) e ibridazione in situ, creato principalmente per applicazioni diagnostiche. Lo strumento è dotato di postazioni dedicate per il caricamento e l'alloggiamento dei vetrini, sistemi separati per la distribuzione dei reagenti che sostituiscono le sonde di aspirazione tradizionale e inoltre permette di applicare manualmente gli anticorpi primari, nei casi in cui è necessario.
I campioni che vengono solitamente utilizzati sono sezioni di tessuto paraffinato (FFPE) o preparati citologici "cell block". È possibile effettuare colorazioni su sezioni di tessuto fresco, che però richiedono più attenzione perché possono alterare la standardizzazione e la riproducibilità dei risultati.

Figure 7 Roche Ventana BenchMark ULTRA

Il principio di funzionamento di questa macchina è automatizzato, ma segue tutte le fasi fondamentali della colorazione immunoistochimica:

- Pretrattamento per il recupero dell'antigene;
- Applicazione degli anticorpi primari;
- Blocco dei segnali endogeni;
- Attivazione del sistema di rilevazione;

- Controcolorazione;
- Risciacqui intermedi al fine di eliminare residui di reagenti e prevenire reazioni aspecifiche.

I reagenti necessari all'esecuzione del protocollo vengono caricati direttamente all'interno dello strumento, che ne effettua la lettura e la validazione tramite sistema di identificazione a codici a barre, assicurando la corretta corrispondenza tra lotto, test e vetrino assegnato. Verificata la disponibilità dei materiali, il sistema avvia automaticamente la corsa analitica secondo il programma selezionato.
Nel corso della procedura, ogni vetrino viene riconosciuto individualmente mediante codice a barre e sottoposto in modo sequenziale alle fasi previste dal protocollo, con dispensazione controllata dei reagenti e applicazione delle condizioni di incubazione impostate (tempo, temperatura e ordine degli step). Tale gestione automatizzata consente una standardizzazione del processo e una riduzione della variabilità operatore-dipendente.
Al termine della colorazione, i vetrini vengono rimossi manualmente e sottoposti a lavaggio con acqua saponata tiepida per l'eliminazione di eventuali residui. Si procede quindi alla disidratazione mediante alcol assoluto e, infine, al montaggio definitivo con applicazione del coprioggetto tramite un mezzo di montaggio permanente, quale il CV Mount, rendendo i preparati idonei alla valutazione microscopica.
Questo apparecchio è formato da varie componenti:

- Sistema di erogazione dei reagenti;
- Carosello situato sotto il coperchio dei reagenti: può ospitare fino a 35 dispenser monouso che vengono utilizzati per erogare anticorpi, enzimi, sistemi di rilevazione o coloranti. I dispenser si dividono in cinque vassoi da sette alloggiamenti e rilasciano un quantitativo di 100 µL di reagente ad ogni vetrino mediante un ugello a molla. I dispenser sono riconosciuti mediante un codice a barre che viene scansionato dalla macchina all'inizio della colorazione. Nel mercato sono disponibili dispenser da 50, 100 o 250 test. Il sistema robotico assicura un rilascio preciso di reagente, ma può presentare alcune volte problemi di erogazione soprattutto per i dispenser di volumi maggiori.
- Trenta cassetti porta vetrini individuali: essi sono disposti in maniera semicircolare sotto il carosello. Ogni cassetto può essere aperto singolarmente ed è formato da una piastra termica ed un modulo di controllo, che garantiscono un riscaldamento rapido (si arriva in circa 3 minuti a 98 °C) e la gestione della temperatura. Il caricamento dei vetrini nei vari cassetti può essere fatto casualmente, ma è possibile farlo solo se tutti i reagenti per la colorazione sono disponibili. Ogni cassetto è dotato di LED e il posizionamento del vetrino è guidato da un supporto ed una guida che ne garantiscono l'alloggiamento corretto. Il vetrino deve

essere posizionato con l'etichetta verso il centro per permettere lo scansionamento del codice a barre. Il motivo per il quale i cassetti porta vetrino sono separati tra loro è quello di prevenire le contaminazioni crociate, anche nel caso in cui durante la procedura il tessuto si stacchi dal vetrino.

Figure 8 Sito di alloggiamento dei vetrini

- Contenitori dei reagenti sfusi posti sotto i cassetti;
- Due vasche per la raccolta dei rifiuti situati sotto i reagenti sfusi;
- Computer dotato di software dedicato per l'avvio della colorazione immunoistochimica: il software presenta un'interfaccia intuitiva e funzionalità avanzate che permettono di monitorare lo stato degli strumenti e l'avanzamento delle colorazioni, scansiona e registra i vetrini e i reagenti impiegati e ne verifica la presenza di tutti quelli necessari prima dell'avvio della procedura. Inoltre, segnala tutti gli errori relativi a condizioni non ottimali come, ad esempio, riscaldamento insufficiente o carenza o errato caricamento dei reagenti. L'operatore può monitorare in tempo reale i tempi di completamento di ciascun vetrino e di controllare il corretto funzionamento della macchina, con la possibilità di verificare la corretta presenza degli anticorpi e dei reagenti inseriti.
- Stampante per etichette.

Per la preparazione dei campioni per l'immunoistochimica, per garantire risultati ottimali, è necessario seguire alcune buone pratiche:

- Usare sezioni istologiche tagliate con uno spessore di circa 3 µm e processarle il prima possibile;

- Non mantenere per troppo tempo le sezioni nel bagno d'acqua per evitare una cottura eccessiva di essa che comprometterebbe l'adesione del tessuto al vetrino;
- Eseguire la pulizia dei vetrini con estrema attenzione, perché una forza eccessiva può danneggiare il tessuto, rendendo più difficile l'esito positivo della colorazione immunoistochimica.

I reagenti bulk utilizzati nel sistema BenchMark ULTRA sono collocati in una zona dedicata al di sotto dell'area di alloggiamento dei vetrini.
Questi reagenti hanno lo scopo di supportare i processi automatizzati della colorazione immunoistochimica e dell'ibridazione in situ.
Il sistema utilizza sette reagenti bulk principali, che si dividono in:

- EZ prep: soluzione detergente per la preparazione dei tessuti;
- ULTRA LCS: a base oleosa, con un sistema di connessione sicura per prevenire la contaminazione crociata tra soluzioni a base acquosa e soluzioni a base oleosa;
- Due SSC Buffer: tampone salino citrato, specifico per l'ibridazione in situ;
- Due Reaction Buffer: tampone di reazione, che viene distribuito uniformemente sui vetrini grazie ad un tubo bilanciatore;
- ULTRA CC1: tampone Tris (pH 8-8,5) che viene utilizzato per il pretrattamento;
- ULTRA CC2: tampone citrato (pH 6). In assenza può essere sostituito da un altro flacone di Reaction Buffer
- Option Bulk: slot dedicato per bulk opzionali, aggiunti in base al tipo di colorazione che viene effettuata.

I reagenti bulk devono essere tutti collegati allo strumento prima dell'inizio della procedura per garantire il corretto funzionamento del sistema.
I contenitori per i reagenti contengono abbastanza quantitativo da completare 30 cicli di colorazione immunoistochimica.

Figure 9 Contenitori per i reagenti utilizzati per supportare le colorazioni IHC e ISH

Nella parte inferiore dello strumento, sono presenti due contenitori da 20 litri ciascuno che sono destinati alla raccolta dei rifiuti. Essi sono montati su carrelli dotati di ruote, per facilitare la rimozione.

Il contenitore, una volta pieno, deve essere rimosso manualmente e i rifiuti smaltiti seguendo le vigenti regole in materia di sicurezza e tutela ambientale. Tra i reagenti più pericolosi a livello ambientale e per questo soggetti a regolamentazione specifica per lo smaltimento è la Diaminobenzidina (DAB), ovvero il cromogeno più comunemente utilizzato nei test immunoistochimici.

Inoltre, la presenza di componenti a diversa natura chimica, alcuni dei quali a carattere oleoso, come l'ULTRA LCS, determina la formazione di due fasi liquide distinte all'interno del contenitore dei rifiuti. La componente acquosa, caratterizzata da una maggiore densità, si dispone sul fondo, mentre quella oleosa, meno densa e non miscibile con la prima, tende a stratificarsi in superficie.

Figure 10 Contenitori con i prodotti di scarto

Il sistema BenchMark ULTRA presenta la tecnologia Ultra Liquid Coverslip (LCS), una tecnologia innovativa sviluppata da Ventana per la colorazione automatizzata dei vetrini.
Attraverso questa tecnologia, un reagente viene distribuito sulla superficie del vetrino uniformemente ed in maniera controllata come se fosse un "coprioggetto liquido".
L'ULTRA LCS è un fluido oleoso che protegge il vetrino durante la fase di colorazione immunoistochimica. Inoltre, permette di:

- Prevenire l'evaporazione del reagente, riducendo la formazione di artefatti durante la procedura;
- Supportare l'incubazione ad alte temperature e i passaggi di incubazione del vetrino;
- Distribuire omogeneamente il reagente sulla superficie del vetrino, permettendo il contatto tra reagente e tessuto;
- Separare la fase acquosa da quella liquida, escludendo così miscelazioni non desiderate.

Questa tecnologia permette di utilizzare poco quantitativo di reagente (100 µL) per coprire il vetrino interamente, ottimizzando sia il consumo di quest'ultimi, ma anche migliorando la qualità dei risultati.
Per quanto riguarda il pretrattamento, essenziale per la preparazione del campione e l'accessibilità antigenica, il sistema BenchMark ULTRA utilizza due soluzioni fornite da Roche, in particolare:

- ULTRA CC1: tampone Tris con un pH compreso tra 8 e 8,5;
- ULTRA CC2: tampone citrato a pH 6, usato per trattamenti ad alte temperature.

A queste due soluzioni è possibile integrare enzimi proteolitici divisi in tre categorie di proteasi che differiscono per l'intensità d'azione:

1. Proteasi 1: ad alta attività proteolitica;
2. Proteasi 2: a media attività proteolitica;
3. Proteasi 3: a bassa attività proteolitica, utilizzata soprattutto per l'ibridazione in situ.

Gli anticorpi che vengono impiegati per la colorazione immunoistochimica sono disponibili in due formati, ovvero nel formato RTU (ready-to-use) quindi anticorpi pronti all'uso e ottimizzati per i processi automatizzati e nel formato concentrato da diluire all'occorrenza in base alle condizioni sperimentali.

I kit di rilevamento cromogenico Ventana vengono prodotti da Roche utilizzano sistemi di rivelazione multimerici. A seconda del kit utilizzato, il polimero agisce come una struttura centrale a cui si legano anticorpi secondari e terziari o enzimi come HRP o AP. Questo sistema permette di migliorare la sensibilità della colorazione, mantenendo molto buona la specificità e limitando la colorazione di fondo.

Vengono utilizzati tre diversi kit di rilevamento:

1. Kit di rilevamento DAB Universale UltraView:

   È un metodo indiretto progettato per l'identificazione di immunoglobuline G murine (IgG), immunoglobuline M murine (IgM) e anticorpi primari di coniglio. Questo sistema di rilevamento utilizzato nelle tecniche di immunoistochimica permette di visualizzare anticorpi primari di murino o di conigli legati ad antigeni presenti in sezioni istologiche di tessuto. Quest'ultimi possono essere fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), sezioni congelate o campioni citologici.

   L'anticorpo primario viene riconosciuto da un anticorpo secondario specifico, legato a sua volta con un anticorpo terziario coniugato con un enzima. Il complesso enzimatico è rilevato con una reazione cromogenica in cui l'enzima catalizza l'ossidazione del 3,3-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB) in presenza di perossido di idrogeno, portando alla formazione di un precipitato di colore marrone che può essere visualizzato al microscopio ottico. Questo sistema è molto utilizzato per l'identificazione di moltissimi marcatori tissutali sia in ambito diagnostico che di ricerca.

   Il kit UltraView Universale DAB è composto da quattro reagenti principali:

- Anticorpi coniugati con perossidasi (HPR-coniugati):

  Miscela di anticorpi anti-IgG e anti-IgM murini e anti IgG di coniglio che sono coniugati con l'enzima perossidasi. Gli anticorpi sono contenuti in una soluzione tampone con ProClin 300, conservante ma anche antimicrobico per garantire la stabilità del prodotto.

- Cromogeno DAB UltraView Universal:

  Soluzione cromogenica con 0,2% di 3,3-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB) sciolta in un conservante che agisce anche da stabilizzatore. In presenza di perossidasi, la DAB viene ossidata con la formazione di un precipitato marrone che ne consente la visualizzazione.
- UltraView Universal DAB H_2O_2:

  Soluzione con 0,04% di perossido di idrogeno in tampone fosfato, utilizzata come substrato nella reazione enzimatica catalizzata dalla perossidasi. L'H_2O_2 agisce come accettore di elettroni nella reazione di ossidazione della DAB
- UltraView Universal Copper

  Soluzione con solfato di rame alla concentrazione di 5 µg/mL e tampone acetato come conservante. Questa soluzione ha lo scopo di aumentare la colorazione del precipitato di DAB, migliorando il contrasto nel tessuto e la stabilità nel tempo.

2. Kit OptiView Diaminobenzidina:

   È un sistema di rivelazione immunoistochimica indiretto dotato di elevata sensibilità e specificità per individuare antigeni tissutali. Il kit viene fornito per l'esecuzione di 250 test.
   La particolarità di questo kit è la presenza di idrossiquinolina (HQ), un chelante organico che serve per potenziare il segnale. È legato ad un anticorpo secondario coniugato, permettendo una maggiore rivelazione degli antigeni a bassa espressione nonostante siano basi anche i livelli di legami aspecifici.
   Il meccanismo di rivelazione cromogenica si basa sull'ossidazione della DAB in presenza di perossido di idrogeno (H_2O_2) e dell'enzima perossidasi (HRP). Anche in questo kit si ha la formazione di un precipitato marrone insolubile che si deposita nel tessuto e viene visualizzato chiaramente al microscopio ottico.
   Per prevenire reazioni aspecifiche, si può effettuare un blocco preliminare delle perossidasi endogene nei tessuti, prima dell'aggiunta dell'anticorpo primario. Questo passaggio è molto importante nei tessuti ricchi di perossidasi endogene come, ad esempio, fegato o midollo osseo.

3. UltraView Fast Red:

   È un sistema di rivelazione indiretto che si basa sull'utilizzo dell'enzima fosfatasi alcalina e consente il rivelamento di anticorpi IgG e IgM murini e di coniglio.

La differenza rispetto ai sistemi basati sulla perossidasi, è che in presenza di fosfatasi alcalina, il cromogeno genera un precipitato di colore rosso intenso, che è visibile poi al microscopio ottico a differenza della DAB che generava un precipitato marrone.

Il Fast Red viene utilizzato in quei casi in cui l'utilizzo della DAB risulta problematico: la scelta tra questi due sistemi di rivelazione dipende principalmente da preferenze di laboratorio, dal tipo di tessuto utilizzato o dalla presenza di elementi interferenti. Ad esempio, la DAB non può essere utilizzata nei tessuti con elevata attività perossidasica endogena perché potrebbe generare colorazioni di fondo aspecifiche.

La DAB non può essere utilizzata neanche per i campioni di cute, dove la presenza di pigmenti naturali come la melanina renderebbe difficoltosa la lettura per la sovrapposizione cromatica tra il pigmento ed il precipitato marrone che si genera; l'utilizzo quindi di questo sistema di rivelazione alternativo permette di avere risultati più chiari e interpretabili

Il kit Fast Red contiene cinque reagenti principali contenuti in flaconi da 25 mL ciascuno, che includono:

- Universal AP Red Multimer

  Miscela di anticorpi secondari coniugati con fosfatasi alcalina, specifici per IgG e IgM murine e anticorpi primari di coniglio. A questa miscela è aggiunto una soluzione tampone con ProClin 300 che agisce da stabilizzatore e antimicrobico
- Universal AP Red Fast red A

  Soluzione contenente ≤1,0% di Fast Red in tampone acetato con ProClin 300.

  È il primo componente cromogenico del sistema bifasico, che insieme al Fast Red b e Naphtol darà origine al precipitato rosso
- Universal AP Red Fast red B

  Soluzione complementare a Fast Red A, contenente anch'essa ≤1,0% di Fast Red in tampone acetato con ProClin 300. Per attivare il cromogeno sono necessarie entrambe le soluzioni
- Universal AP Red Fast red Naphtol

  Reagente all'interno del quale è presente ≤1,0% di Naphtol in tampone Tris con ProClin 300.

  Il Naphtol è il substrato della fosfatasi alcalina, reazione che porta alla formazione del precipitato cromogenico rosso.
- Universal AP Red Fast red Enhancer

  Soluzione contenente ≤3,0% di cloruro di magnesio ($MgCl_2$) in tampone Tris con ProClin 300. L'aggiunta di magnesio favorisce l'attività enzimatica della fosfatasi alcalina, permettendo di intensificare la reazione cromogenica.

Nei casi in cui, in accordo con la letteratura, si deve attuare una colorazione immunoistochimica di antigeni debolmente espressi si usano kit in grado di amplificare il segnale cromogenico, come ad esempio l'OptiView Amplification kit, che viene utilizzato sempre in combinazione con l'OptiView DAB IHC Detection kit.
Questo sistema di amplificazione si basa su un coniugato contenente aptene HQ, il substrato, e un anticorpo monoclonale anti-HQ di origine murina associato all'enzima perossidasi (HRP). Questo permette di aumentare molto la quantità di enzimi presenti nel sito di legame antigenico, amplificando quindi il segnale prodotto dalla reazione cromogenica con la DAB.
L'OptiView Amplification kit si applica tra l'anticorpo primario e il multimero, migliorando notevolmente la sensibilità dei saggi IHC.
Il protocollo segue i seguenti passaggi:

- Applicazione OptiView HRP Mutimer;
- Aggiunta dei reagenti OptiView Amplifier e OptiView Amplification H_2O_2;
- Lavaggio del vetrino e trattamento con OptiView Application Multimer;
- Ulteriore lavaggio;
- Aggiunta sequenziale dei reagenti OptiView DAB, OptiView H_2O_2 e OptiView Copper, per ottimizzare la visualizzazione del precipitato.

Questo kit, come detto, è molto utile per evidenziare antigeni poco espressi o presenti in basse concentrazioni, aumentando il numero di perossidasi presenti coinvolti nella reazione cromogenica.
Sebbene sia utile questa strategia, possiede alcune criticità perché può aumentare il tempo totale del test, il protocollo da attuare è più complesso e i costi dell'analisi.

2.1.1. Controlli di qualità: controllo positivo e controllo negativo

Nelle tecniche immunoistochimiche, è necessario adottare controlli di qualità per garantire l'affidabilità e la riproducibilità dell'analisi.
Perciò, per ciascuna procedura di colorazione, è necessario aggiungere una sezione di tessuto di controllo positivo sullo stesso vetrino contenente il campione del paziente.
Questo permette di rilevare, nel caso ci siano, errori tecnici come ad esempio la mancata applicazione dell'anticorpo primario o di reagenti importanti nella buona riuscita della reazione, contribuendo così alla validazione dell'intero processo analitico.
Il tessuto destinato al controllo deve provenire da fonti affidabili e correttamente documentate, come ad esempio autopsie, biopsie diagnostiche o campioni ottenuti mediante resezione chirurgica. Le fasi di fissazione e le modalità di conservazione devono essere adeguate, perché un'alterazione di questi

passaggi potrebbe compromettere la preservazione degli epitopi e, di conseguenza, l'affidabilità della reazione immunoistochimica.

L'utilizzo di sezioni istologiche fissate e incluse in paraffina, posizionate su vetrini di controllo permette di verificare tutte le fasi del protocollo: recupero antigenico, incubazione con l'anticorpo primario, applicazione del sistema di rivelazione e sviluppo del cromogeno. Il controllo positivo è quindi uno strumento di validazione tecnica della colorazione intera.

La valutazione preliminare del controllo positivo è imprescindibile: deve mostrare una reattività specifica, evidenziata dalla formazione di un precipitato cromogenico di colore bruno nelle aree che esprimono l'antigene ricercato. L'intensità del colore può variare in base al livello di espressione antigenico. Anche una colorazione blanda, quindi una positività debole, se coerente con distribuzione e localizzazione cellulare, può essere considerato un parametro adeguato all'interpretazione dei clinici.

Se il controllo positivo non evidenzia una colorazione appropriata o un pattern non conforme a quello atteso, l'intera procedura viene considerata non valida e l'indagine deve essere ripetuta.

Nel caso di antigeni a localizzazione nucleare, il controllo positivo deve avere una colorazione nucleare nelle cellule tumorali vitali; la stessa positività può essere osservata nei linfociti, nei fibroblasti o nell'epitelio adiacente alla neoplasia, in accordo con il profilo di espressione noto del marcatore.

Dopo aver confermato la validità del controllo positivo, è ugualmente indispensabile analizzare il controllo negativo, il cui obiettivo è quello di dimostrare l'assenza di segnale nelle aree che non dovrebbero esprimere l'antigene bersaglio. Questa verifica permette di escludere colorazioni aspecifiche, legami non selettivi dell'anticorpo primario interferenze generate dai reagenti del sistema di rivelazione.

Un controllo negativo adeguato si caratterizza per la completa assenza di precipitato cromogenico nelle regioni prive dell'antigene target, attestando così l'elevata specificità della reazione immunoistochimica e la correttezza tecnica della procedura.

Nel caso in cui si osservino depositi cromogenici inattesi o colorazioni non compatibili con l'assenza dell'antigene, i risultati ottenuti sui campioni del paziente non possono essere considerati affidabili. In questo caso, la colorazione viene invalidata e deve essere ripetuta per garantire l'accuratezza diagnostica.

2.1.2. Protocollo

Le sezioni istologiche vengono tagliate, asciugate, etichettate e caricate sullo strumento BenchMark ULTRA. Prima dell'avvio della colorazione, il sistema effettua un controllo automatico del

caricamento corretto dei reagenti e dei contenitori dei rifiuti. Il protocollo non parte fino a che tutte le risorse necessario sono state caricate.

Il protocollo della colorazione immunoistochimica segue una sequenza di passaggi prestabilita, che è automatizzata dal sistema, che include le seguenti fasi:

1. Dewaxing (rimozione della paraffina): le sezioni istologiche, che sono incluse in paraffina, vengono sottoposte ad un trattamento che porta alla rimozione della paraffina per eliminarla completamente, al fine di garantire l'accessibilità degli antigeni.
2. Recupero dell'antigene: in questa fase vengono eliminate le alterazioni conformazionali degli antigeni determinate dal processo di fissazione, di norma attraverso un recupero antigenico a caldo in un tampone specifico, così da rendere nuovamente disponibile l'epitopo di interesse per il riconoscimento da parte dell'anticorpo.
3. Aggiunta dell'anticorpo primario: l'anticorpo specifico viene applicato per legarsi selettivamente all'antigene presente nella sezione tissutale.
4. Blocco: viene effettuato un passaggio di blocco per minimizzare le interazioni non specifiche, riducendo la possibilità di colorazioni di fondo.
5. Sistema di rilevamento: applicazione del sistema di rilevazione prescelto (ad esempio con UltraView o OptiView), che consente la visualizzazione del legame anticorpo-antigene attraverso la produzione di un precipitato cromogenico.
6. Controcolorazione: si applica una colorazione di contrasto, in genere l'ematossilina, per evidenziare la morfologia tissutale e facilitare l'interpretazione microscopica.

Al termine della procedura, le sezioni vengono rimosse e coperte con vetrino coprioggetto. I vetrini vengono poi sottoposti alla valutazione morfologica e controllo qualità da parte del medico patologo.

2.2. Anticorpi per l'interpretazione dell'instabilità microsatellitare e procedura di immunoistochimica associata

L'indagine dell'instabilità dei microsatelliti (MSI) attraverso la metodica immunoistochimica (IHC) si fonda sull'utilizzo di un pannello composto da quattro anticorpi monoclonali specificatamente diretti contro le proteine chiave del sistema di riparazione del mismatch del DNA (MMR).
Il Ventana MMR IHC Panel rappresenta uno dei sistemi più impiegati per la definizione del profilo molecolare dei carcinomi dell'endometrio, consentendo di distinguere le neoplasie in base alla presenza o alla perdita dell'espressione delle proteine coinvolte nel pathway MMR.
La conservazione della positività nucleare per tutti e quattro i marcatori nelle cellule nucleari indica un fenotipo MMR conservato (pMMR). Al contrario, la mancata evidenza di colorazione nucleare per uno o più componenti del pannello è indicativa di deficit del sistema MMR (dMMR), condizione frequentemente correlata a instabilità microsatellitare.
Il pannello include quattro anticorpi monoclonali:

- Anti-MLH1 (clone M1)
- Anti-MSH2 (clone G219-1129)
- Anti-PMS2 (clone A16-4)
- Anti-MSH6 (clone SP93)

Questi anticorpi sono di origine murina contro le corrispondenti proteine MMR (mismatch repair) del DNA MLH1, MSH2, PMS2 e MSH6.
Sono prodotti utilizzando forme ricombinanti a lunghezza intera delle proteine bersaglio, dotate di un tag glutatione-S-transferasi (GST) per facilitare purificazione e riconoscimento.
Il pannello è progettato per il rilevamento immunoistochimico dell'espressione delle proteine MMR, che sono espresse in maniera ubiquitaria sia nelle cellule normali che in quelle neoplastiche in proliferazione.
La perdita di espressione di una o più di queste proteine nei tessuti tumorali, rilevata con l'utilizzo di questi anticorpi, viene indicata con fenotipo MMR-deficiente (dMMR).
Questo fenotipo è tipico di un istotipo caratteristico di neoplasie caratterizzate da instabilità dei microsatelliti (MSI).
Gli anticorpi monoclonali specifici per le proteine MMR interagiscono con i rispettivi antigeni presenti in sezioni tissutali fissate in formalina e incluse in paraffina (FFPE). La rilevazione del legame antigene-anticorpo si realizza attraverso un anticorpo secondario coniugato con un aptene, al quale viene successivamente associato un complesso multimerico anti-aptene legato alla perossidasi di rafano (HRP).

L’enzima HRP catalizza la trasformazione del cromogeno DAB in un deposito bruno insolubile, che rende identificabile al microscopio ottico le sedi di espressione antigenica.

Ogni passaggio del protocollo prevede tempi di incubazione definiti e condizioni termiche controllate, seguiti da lavaggi automatizzati effettuati dallo strumento. I cicli di lavaggio interrompono la reazione e rimuovono il materiale aspecifico legato, limitando la colorazione di fondo e migliorando la qualità interpretativa.

Al fine di garantire la validità tecnica della colorazione, ciascuna sessione deve includere un controllo negativo, costituito da un vetrino trattato con un anticorpo monoclonale murino privo di specificità per l’antigene target, consentendo di valutare l’eventuale presenza di colorazione specifica.

Questa analisi è ampiamente validata in ambito diagnostico ed è molto utile anche per l’individuazione di neoplasie associate a predisposizioni ereditarie come, ad esempio, la sindrome di Lynch e riveste un ruolo determinante nell’orientamento terapeutico, in particolare per l’accesso a trattamenti di immunoterapia.

Figure 11 Siringhe contenenti gli anticorpi per la rilevazione delle proteine MMR e reagenti utilizzati per la reazione cromogenica

2.3.Interpretazione della colorazione

La colorazione ottenuta con gli anticorpi diretti contro le proteine del sistema mismatch repair (MMR) si manifesta con colorazione nucleare nelle cellule in attiva proliferazione. L'interpretazione di quest'ultima viene effettuata da un patologo che assegna lo stato MMR in base alla presenza o meno di colorazione nelle cellule tumorali. Per questa valutazione è sempre necessario il vetrino colorato in ematossilina-eosina per poter riconoscere la zona tumorale rispetto al tessuto normale. Possono configurarsi due fenotipi principali:

- Fenotipo MMR conservato che viene attribuito nei casi in cui si osserva una colorazione nucleare intatta all'interno delle cellule tumorali con controlli positivi interni adeguati come ad esempio presenza di colorazione nucleare nei linfociti o nell'epitelio sano intorno al tumore.

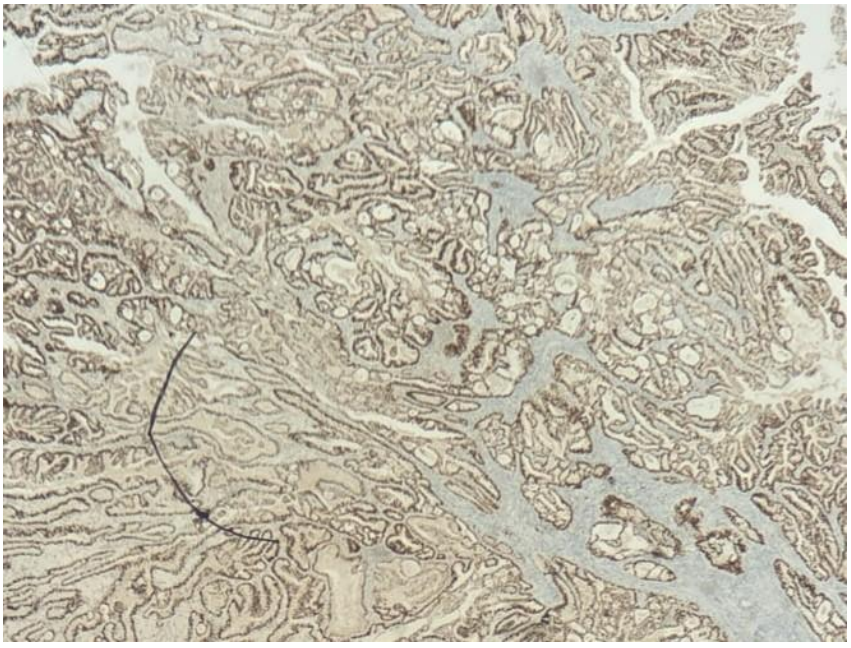

Figure 12 Analisi immunoistochimica delle proteine MMR nel carcinoma dell'endometrio. Espressione delle proteine MMR conservata

- Fenotipo MMR non conservato viene attribuito quando si rileva una perdita nucleare o una colorazione debole ed equivoca nelle cellule tumorali attive, con adeguata presenza di controlli positivi interni. Questa condizione viene chiamata deficienza del sistema MMR (o dMMR). Solitamente, nel carcinoma dell'endometrio, per attribuire il fenotipo dMMR, è necessario che almeno il 10% dell'intera area tumorale mostri una perdita subclonale di espressione delle proteine MMR. Tuttavia, in questi casi, si cerca un ulteriore conferma andando a studiare l'instabilità dei microsatelliti attraverso la biologia molecolare.

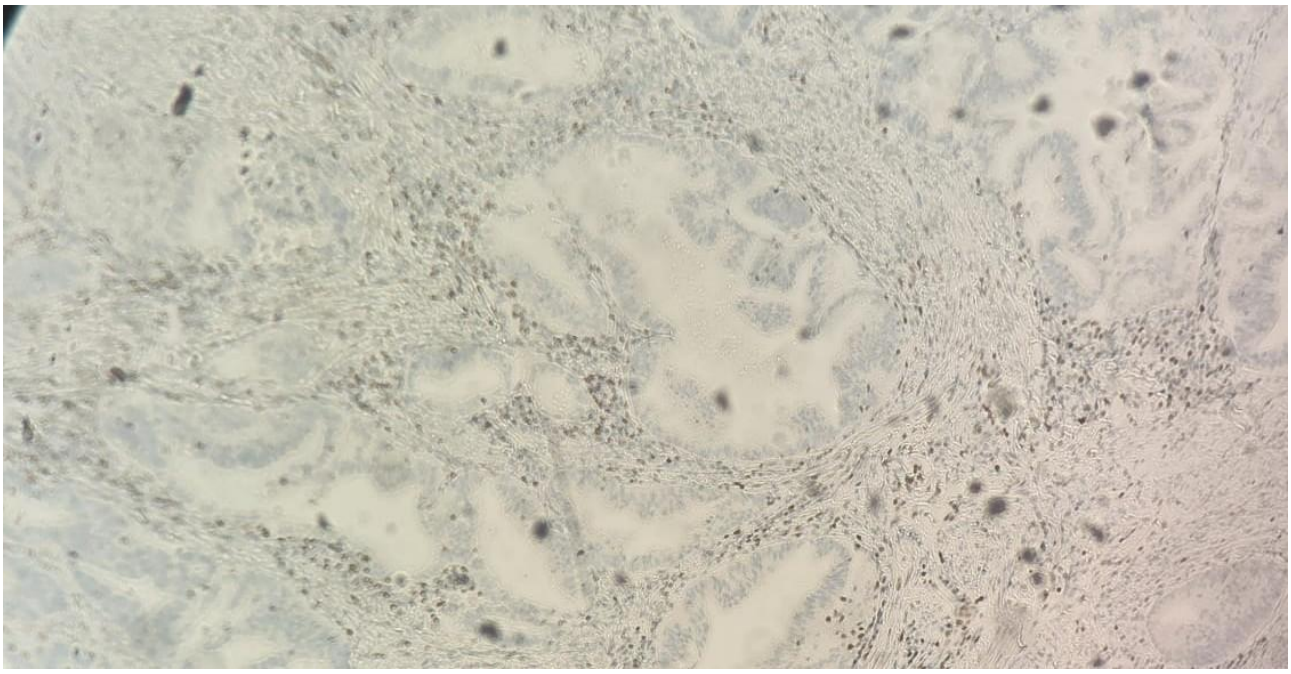

Figure 13 Perdita totale di espressione in un caso di carcinoma dell'endometrio

Le proteine MMR, per svolgere le loro funzioni, formano eterodimeri (in particolare MLH1-PMS2 e MSH2-MSH6); in generale la perdita di MLH1 è tipicamente associata alla perdita di PMS2 mentre la perdita di MSH2 è associata alla perdita di MSH6. Per questo motivo i vetrini con la colorazione immunoistochimica devono essere sempre visualizzati a coppie.

Ci sono casi in cui però possono essere persi singolarmente PMS2 o MSH6 senza influenzare l'espressione dell'altra proteina della coppia. Questa condizione si verifica nel momento in cui PMS2 viene sostituito da PMS1 o MLH3 e MSH6 viene sostituito da MSH3. Anche in questi casi è necessario effettuare una verifica tramite la biologia molecolare. (Addante et al. 2024).

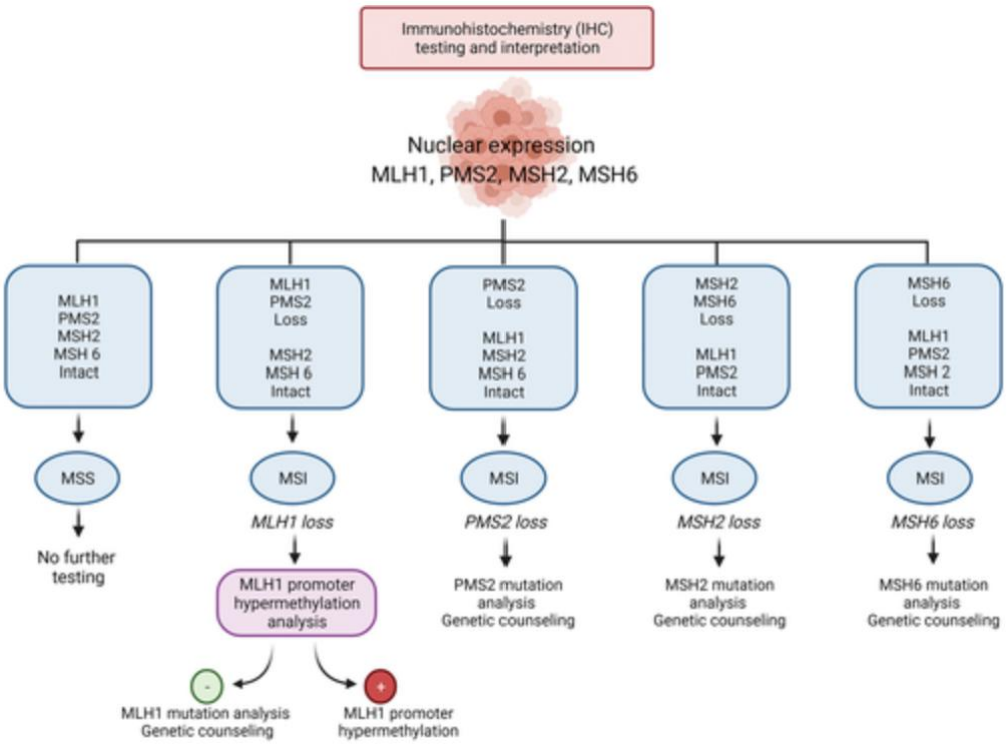

Figure 14 Interpretazione immunoistochimica delle proteine MMR

L'analisi immunoistochimica delle proteine del mismatch repair è il test di riferimento per la valutazione molecolare del carcinoma dell'endometrio perché presenta molti vantaggi, tra cui l'ampia disponibilità dell'IHC in quasi tutti i laboratori, il costo inferiore rispetto alla PCR o l'NGS e l'elevata concordanza con le analisi in biologia molecolare (circa il 94%).

Tuttavia, ci sono condizioni in cui è necessario richiedere l'analisi dell'instabilità dei microsatelliti in biologia molecolare oltre che l'analisi immunoistochimica, tra cui (Addante et al. 2024):

- risultati anomali come, ad esempio, una colorazione del controllo interno buona, ma il tessuto tumorale mostra la perdita di espressione delle proteine MMR minore del 10% oppure il tessuto tumorale presenta un'intensità di colorazione nettamente inferiore o assente rispetto al controllo interno;
- risultati ambigui come colorazione del tessuto molto debole sia nel controllo interno che nel tessuto tumorale;
- l'analisi immunoistochimica porta a risultati falsi negativi dovuti alla scarsa fissazione preanalitica del tessuto;
- risultati aberranti, come ad esempio colorazione citoplasmatica, puntiforme (colorazione nucleare discontinua all'interno dei nuclei tumorali) e perinucleare. In questo caso in

particolare, prima dell'analisi in biologia molecolare, si effettua un'altra colorazione immunoistochimica su una sezione diversa;

- la perdita di una sola subunità eterodimerica (perdita solo di MLH1 o PMS2 e non entrambi).

2.4. Analisi molecolare dell'instabilità microsatellitare

Per analizzare l'instabilità dei microsatelliti viene utilizzato il kit EasyPGX® ready MSI, un test diagnostico per uso in vitro creato per studiare l'instabilità del DNA genomico isolato da tessuto fresco, congelato, fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE), oppure da sangue periferico.
Il test è basato sull'amplificazione mediante PCR end-point, seguita da analisi dei target attraverso il profilo di denaturazione. Vengo utilizzati i seguenti marcatori:

MARCATORE	GENE	NCBI Ref. Seq. (GRCh 38.p12)	CROMOSOMA
BAT25	cKIT	NC_000004.12	4 (4q12)
BAT26	MSH2	NC_000002.12	2 (2p21-p16.3)
NR21	SLC7A8	NC_000014.9	14 (14q11.2)
NR22	STT3A	NC_000011.10	11 (11q24.2)
NR24	ZNF2	NC_000002.12	2 (2q11.1)
NR27	BIRC3	NC_000011.10	11 (11q22.2)
CAT25	CASP2	NC_000007.14	7 (7q34)
MONO27	MAP4K3	NC_000002.12	2 (2p22.1)

Figure 15 Marcatori utilizzati per l'analisi molecolare delle proteine MMR

La procedura consiste inizialmente nell'estrazione del DNA mediante lisi grezza seguita da un amplificazione end-point con selezione e amplificazione delle regioni di DNA contenenti i microsatelliti analizzati ed un'ibridazione di sonde marcatore-specifiche con il DNA target per ottenere un profilo di denaturazione e valutare i campioni idonei e non idonei. L'analisi finale verrà poi effettuata attraverso l'uso di un software dedicato per determinare l'instabilità microsatellitare.
Il kit "EasyPGX® ready MSI" è composto da strip di 8 provette per PCR end-point (BIANCO) e strip di 8 provette per l'ibridazione (NERO).
Il kit "EasyPGX® ready MSI" permette di amplificare brevi tratti del DNA contenenti le sequenze microsatellitari. Attraverso il successivo passaggio di denaturazione e ibridazione con sonde saggio-specifiche, è possibile identificare lo stato di stabilità o instabilità di ogni singolo microsatellite, confrontando il segnale del campione clinico con quello di un controllo positivo stabile.
L'estrazione del DNA è effettuata utilizzando lo strumento automatico MagCore, una piattaforma adatta per l'isolamento di acidi nucleici (DNA e RNA) da varie tipologie di matrice biologica, come

tessuti inclusi in paraffina (FFPE), campioni freschi, biopsie liquide e sangue periferico. La qualità del DNA estratto dipende molto dalle condizioni dei tessuti paraffinati. Sono raccomandati tempi di fissazione non superiori alle 14-24 ore e una soluzione di formalina compresa tra il 4-10%. Per evitare contaminazioni crociate tra i vari campioni, è necessario che il tecnico di laboratorio pulisca bene le lame del microtomo tra un taglio e l'altro.

È bene estrarre il DNA da sezioni di tessuto FFPE di 5 x 10 µm e il campione dovrebbe contenere almeno il 50% di cellule neoplastiche, o non meno di 100 cellule neoplastiche in toto. Per ciascuna matrice vengono utilizzati kit specifici al fine di garantire l'ottimizzazione dell'efficienza estrattiva e la riduzione delle contaminazioni.

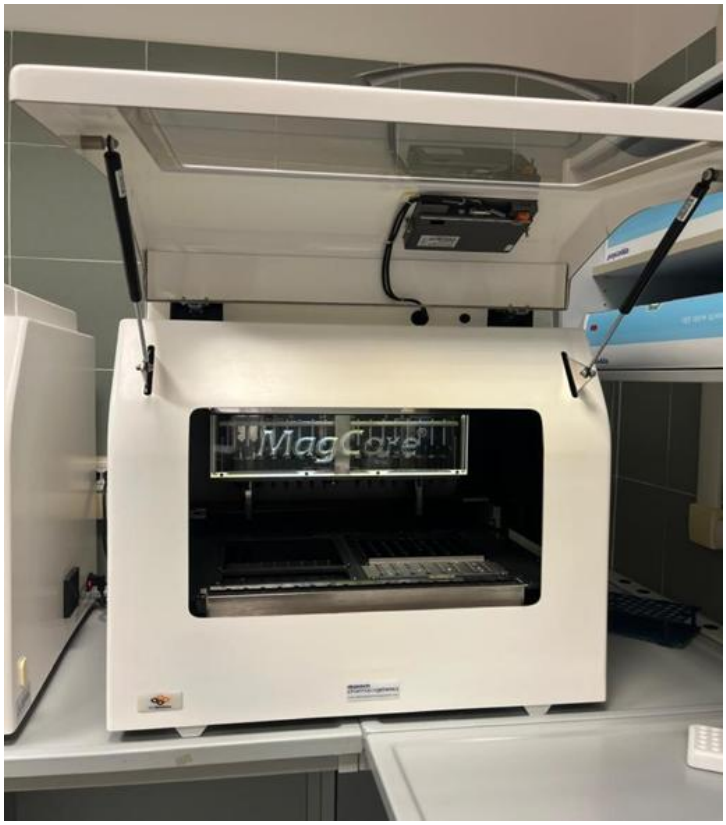

Figure 16 Estrattore per gli acidi nucleici MagCore

Dopo l'accensione dello strumento, si rimuovono i supporti interni, ovvero il rack porta tubi e puntali e il rack porta cartucce. Le cartucce vengono inserite nel supporto mantenendo tra loro distanza, al fine di evitare la contaminazione crociata tra i vari campioni durante la procedura automatizzata.

In ciascun primo pozzetto delle cartucce viene dispensato 450 µL di olio; è possibile utilizzare lo stesso puntale per diverse cartucce perché in questa fase tutti i reagenti e i materiali utilizzati sono sterili.

Dopodiché vengono aggiunti 20 µL di Proteinasi K, un enzima proteolitico necessario per la digestione delle proteine tissutali e la liberazione degli acidi nucleici, che viene conservato a -20 °C. prima di inserirla insieme ai campioni, bisogna centrifugare brevemente l'enzima per raccogliere il contenuto sul fondo della provetta. Il puntale deve essere cambiato, tra una dispensazione e l'altra, per evitare contaminazioni.

La quantità di parafilm da predisporre viene stabilita in funzione del numero di campioni da analizzare. Successivamente si preparano appositi tappi perforati, dotati di un foro centrale, che consentono l'inserimento del puntale dello strumento durante le fasi automatizzate di aspirazione e dispensazione dei reagenti.

Nei pozzetti preparati in precedenza vengono inseriti i campioni biologici, che solitamente sono riccioli di tessuto paraffinato, insieme all'olio e alla Proteinasi K. I pozzetti vengono poi sigillati con tappi forati per garantire la stabilità e l'accessibilità durante il processo.

I puntali vengono posizionati nel rack mettendo in seconda posizione il puntale con il contenitore e in terza posizione il puntale privo di filtro.

In quinta posizione vengono posizionate le provette di raccolta con il tappo aperto, dove sarà eluato il DNA alla fine del processo. Ogni provetta viene etichettata riportando l'anno e il numero istologico del campione, così da poterlo tracciare durante tutte le analisi successive.

Una volta completato l'allestimento, i rack (porta cartucce e porta puntali) vengono inseriti all'interno dello strumento. A questo punto si configura il software di estrazione selezionando l'opzione di eluizione in un volume finale di 60 µL. il programma dura in tutto circa 2 ore e 30 minuti e prevede il riscaldamento fino a 70 °C, utile per favorire la digestione proteolitica e la successiva fase di separazione.

Nelle primissime fasi del processo automatico, è molto importante monitorare il corretto movimento del lisato all'interno dei puntali, coì da evitare eventuali ostruzioni od eventualmente interrompere momentaneamente il processo al fine di sistemare eventuali errori della macchina.

Le cartucce, al loro interno, contengono biglie magnetiche, che sono fondamentali nel legame selettivo con il DNA. Esse una volta attivate si legano agli acidi nucleici presenti nel lisato, consentendo anche una purificazione efficace attraverso passaggi di lavaggio successivo.

Completata l'estrazione del DNA, si procede come da protocollo con l'amplificazione dei frammenti microsatellitari. Prima di iniziare con questa procedura, si raccomanda la decontaminazione di tutto quello che serve per il test, come pipette, banconi e cappe attraverso l'irradiazione con raggi UV per eliminare l'eventuale presenza di tracce di DNA.

Al termine dell'estrazione, i campioni vengono rimossi dallo strumento MagCore. Le provette Eppendorf con l'eluato del DNA vengono centrifugate per alcuni minuti, per raccogliere il contenuto sul fondo e rendere omogenea la soluzione.

Successivamente, si passa alla diluizione del DNA in nuove Eppendorf prelevando, per ciascun campione, 30 µL di DNA diluendoli in 180 µL di acqua ultrapura, per ottenere un volume finale di 210 µL; inoltre vengono allestiti anche il campione di controllo positivo (25 µl EasyPGX MSI pos ctrl risospeso) e di controllo negativo (25 µL di acqua).
Finita la diluizione, si utilizzano delle strip di PCR per l'amplificazione dei microsatelliti costituite da otto posizioni contenenti i reagenti specifici per l'amplificazione delle seguenti regioni microsatellitari:

- Posizione 1: BAT25
- Posizione 2: BAT26
- Posizione 3: NR21
- Posizione 4: NR22
- Posizione 5: NR24
- Posizione 6: NR27
- Posizione 7: CAT25
- Posizione 8: MONO27

In ogni pozzetto della strip vengono inseriti 25 µL della diluizione di DNA precedentemente preparata. Nell'ultimo pozzetto della strip viene distribuito 25 µL di controllo positivo.
Completata la distribuzione, le strip vengono sigillate con pellicole adesive termosensibili, adatte per poter essere rimosse senza compromettere l'integrità del contenuto della provetta.
Le strip vengono prima centrifugate per qualche secondo per garantire l'omogeneità del contenuto, dopodiché vengono inserite nell'amplificatore termico e si avvia il ciclo di amplificazione, che dura circa 1 ora e 15 minuti.
Questa fase non prevede un monitoraggio in tempo reale dell'amplificazione, dato che non si tratta di una PCR real time, pertanto l'analisi verrà effettuata successivamente.
Al termine dell'amplificazione, si passa alla fase di purificazione del DNA amplificato, che ha lo scopo di rimuovere la presenza di eventuali impurità e per preparare il campione all'ibridazione finale.
Le strip PCR contenenti i campioni vengono centrifugate brevemente per raccogliere il contenuto sul fondo dei pozzetti, successivamente si passa alla preparazione del Binding Mix, una soluzione che

permette il legame selettivo del DNA alle biglie magnetiche di agarosio ricoperte di streptavidina (Sequencing Beads 5 ml), fondamentali per la purificazione.
La Binding Mix si prepara seguendo il seguente schema:

Binding-Mix	Volume reagente per 1 reazione (µl)	Volume reagente (µl) per una seduta da 8 x n campioni inclusi i controlli									
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MB water	12	360	480	600	720	840	960	1080	1200	1320	1440
SEQ binding buffer	35	1050	1400	1750	2100	2450	2800	3150	3500	3850	4200
SEQ beads (1)	3	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Volume Totale	50	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000	5500	6000

Figure 17 Componenti per la preparazione del Binding Mix

Il volume di Binding Mix da preparare è proporzionato al numero di strip da analizzare. Ad esempio, nel caso di tre strip da processare, la preparazione prevede la miscelazione dei seguenti reagenti, per un totale di 1500 µL:

- 360 µL di acqua MB;
- 1050 µL di binding buffer;
- 90 µL di Seq beads (biglie magnetiche).

Il Binding Mix viene preparato all'interno di una vaschetta apposita mescolando i vari reagenti utilizzando un pipetta graduata p1000. Successivamente, grazie all'utilizzo di una pipetta multicanale, si distribuiscono 50 µL di Binding Mix in ciascun pozzetto delle strip. Le strip poi vengono sigillate con una pellicola termosensibile, applicata accuratamente per garantire l'aderenza.
Le strip vengono caricate in un agitatore per 15 minuti a 1400 rpm o, comunque, fino a quando non si procede con la denaturazione dei prodotti di amplificazione. Questo tempo ridotto garantisce lo stesso il legame del DNA alle biglie magnetiche.
Nel frattempo, si preparano nuove strip contenenti sonde liofilizzate pari al numero delle strip processate. In ogni pozzetto viene aggiunto 25 µL di buffer di ibridazione, per raggiungere il volume complessivo dato sempre in relazione al numero di campioni analizzati (ad esempio con 3 campioni processati si raggiunge un volume complessivo di 750 µL).

Reagente	Volume reagente per 1 reazione (µl)	Volume reagente (µl) per una seduta da 8 x n strip									
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hybridization buffer	25	750	1000	1200	1500	1750	2000	2250	2500	2750	3000

Figure 18 Tabella con volume reagente Hybridization buffer per numero di strip processate

Terminata la fase di agitazione, inizia la procedura di vera e propria purificazione, che viene eseguita dallo strumento EasyPGX hybridization tool dotato di:

- Piattaforma per le strip utilizzate per l'amplificazione;
- Spazzola con sistema di aspirazione;
- Serie di vaschette contenenti i reagenti di lavaggio, che includono 180 ml di etanolo 70%, 120 ml di SEQ denaturation solution e 150 ml di washing buffer;
- Seconda piattaforma con le strip da utilizzare durante la fase di ibridazione in modo da depositare le biglie magnetiche.

Figure 19 Strumento EasyPGX hybridization tool

La procedura inizia con l'utilizzo della spazzola, che deve essere collocata nella parking position water e sottoposta a una condizione di vuoto per circa 20 secondi.
Successivamente, le strip vengono trasferite dall'agitatore alla piattaforma destinata alle strip di amplificazione. In questa fase, attraverso la spazzola si procede con l'aspirazione delle biglie che contengono i prodotti di amplificazione presenti all'interno delle strip.
L'azione del vuoto consente alle biglie di aderire ai tubicini della spazzola, permettendo così il loro spostamento verso le fasi successive del protocollo.
Poiché le biglie tendono a sedimentare molto velocemente, è importante che tra il termine dell'agitazione delle strip e l'aspirazione delle biglie passi pochissimo tempo (meno di un minuto), così da assicurare una cattura efficiente delle particelle.

In seguito, la spazzola con le biglie attaccate ai tubicini viene immersa in una vaschetta contenente etanolo al 70% per circa 5 secondi. Terminato questo passaggio, la spazzola viene trasferita nella soluzione di denaturazione per altri 5 secondi e successivamente immersa nel washing buffer per lo stesso intervallo di tempo.
Una volta completata questa sequenza di trattamenti, la spazzola viene sollevata e mantenuta in posizione verticale, con un'inclinazione superiore ai 90°, per alcuni secondi. Questo passaggio consente la rimozione completa dei reagenti residui, che vengono aspirati e convogliati nella tanica destinata alla raccolta dei rifiuti liquidi.
Successivamente, la spazzola con le biglie ancora ancorate ai tubicini viene trasferita nella postazione dedicata contenente le strip con le sonde liofilizzate, predisposte per la fase di ibridazione. Le biglie vengono quindi rilasciate completamente all'interno delle strip, consentendo l'avvio della reazione di ibridazione. Per finire, la spazzola viene immersa nell'ultima vaschetta contenente Seq Water per eseguire il lavaggio e il risciacquo finale.
Una volta terminata la fase di purificazione, si procede con l'ibridazione, passaggio cruciale per l'individuazione di eventuali instabilità microsatellitari. Le strip contenenti le sonde liofilizzate, nelle quali è presente il DNA legato alle biglie magnetiche, vengono chiuse con appositi tappi in plastica per garantire una corretta sigillatura durante le variazioni di temperatura.
Successivamente, le strip vengono posizionate nello strumento destinato all'ibridazione automatizzata, il dispositivo esegue il ciclo termico secondo le condizioni previste dal protocollo sperimentale, assicurando parametri controllati e riproducibili che consentono un'ibridazione efficace e specifica tra le sonde liofilizzate e i target molecolari presenti nei campioni.
Il ciclo di ibridazione comprende:

- Denaturazione iniziale: 95 °C per 1 minuto, fase che permette la separazione dei due filamenti di DNA e rende disponibili le sequenze bersaglio per l'interazione con le sonde;
- Ciclo di variazione termica: oscillazione programmata della temperatura tra 40 °C e 90 °C per una durata totale di 20 minuti, che favorisce l'ibridazione selettiva tra le sequenze marcate e i target microsatellitari.

Al termine del ciclo, lo strumento conclude la procedura consentendo l'esportazione dei dati ottenuti. È necessario verificare che i controlli di reazione, sia positivo che negativo, risultino corretti e non presentino errori.
I dati generati vengono quindi trasferiti su un supporto esterno, come ad esempio una chiavetta USB, per essere successivamente analizzati e interpretati mediante software dedicati.

3. RISULTATI

La fase conclusiva del protocollo prevede l'analisi dei risultati ottenuti dal ciclo di ibridazione. I risultati vengono elaborati tramite software, in particolare EasyPGX® Analysis Software, che consentono la visualizzazione e il confronto dei profili dei marcatori microsatellitari.

Nell'analisi si procede un campione alla volta, confrontando, per ogni marcatore, la curva di melt del campione con quella del controllo positivo stabile. Si considera il valore di ΔTm (differenza tra Tm campione e Tm del controllo positivo), come riportato nella tabella.

Saggio	ΔTm*	Risultato
BAT25	< -3	BAT25 instabile
BAT26	< -3	BAT26 instabile
NR21	< -3	NR21 instabile
NR22	< -3.5	NR22 instabile
NR24	< -3	NR24 instabile
NR27	< -3	NR27 instabile
CAT25	< -3	CAT25 instabile
MONO27	< -3.5	MONO27 instabile
BAT25	≥ -3	BAT25 stabile o inferiore al limite di rilevabilità del sistema
BAT26	≥ -3	BAT26 stabile o inferiore al limite di rilevabilità del sistema
NR21	≥ -3	NR21 stabile o inferiore al limite di rilevabilità del sistema
NR22	≥ -3.5	NR22 stabile o inferiore al limite di rilevabilità del sistema
NR24	≥ -3	NR24 stabile o inferiore al limite di rilevabilità del sistema
NR27	≥ -3	NR27 stabile o inferiore al limite di rilevabilità del sistema
CAT25	≥ -3	CAT25 stabile o inferiore al limite di rilevabilità del sistema
MONO27	≥ -3.5	MONO27 stabile o inferiore al limite di rilevabilità del sistema

Figure 20 Marcatori genetici con temperatura di melt associata e relativa interpretazione

Dall'analisi dei dati della tabella, è possibile comprendere che nel caso in cui il valore di ΔTm è inferiore a -3 o -3,5, i marcatori vengono considerati come instabili.

L'instabilità si manifesta, per ogni marcatore, attraverso un valore di ΔTm diverso dal controllo e graficamente mediante curve di melting anomale caratterizzate da picchi multipli o un profilo irregolare, quindi non sovrapponibile a quelle del controllo positivo. Queste due anomalie sono indicative della presenza di instabilità microsatellitare.

Contrariamente, se il valore della ΔTm è superiore a -3 o -3,5 e i grafici della curva di melting sono quasi sovrapponibili a quelli del controllo positivo (o comunque mostrano picchi ben delineati coerenti con il controllo positivo), i marcatori vengono considerati stabili, permettendo di concludere l'analisi con il risultato di assenza di instabilità microsatellitare.

Marcatore BAT25

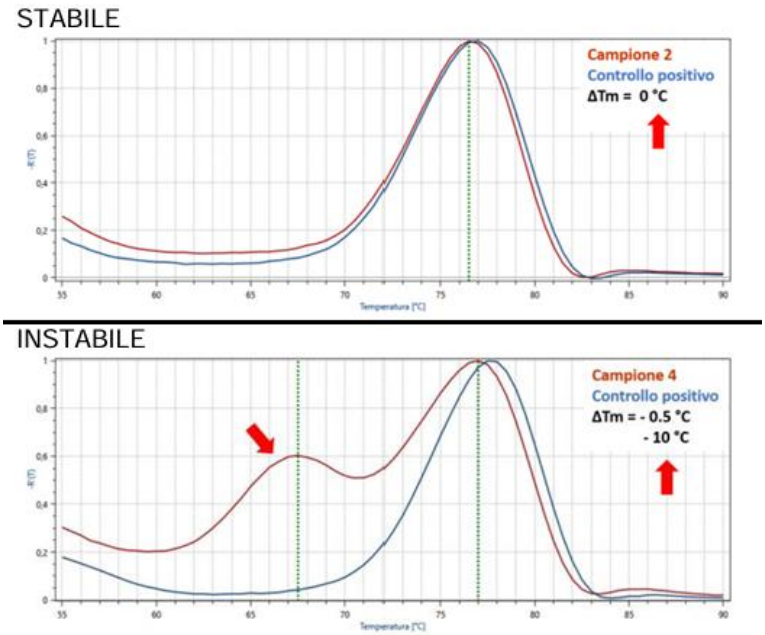

Figure 21 Curve di melting rappresentanti le condizioni stabili ed instabili del marcatore BAT25

Marcatore NR21

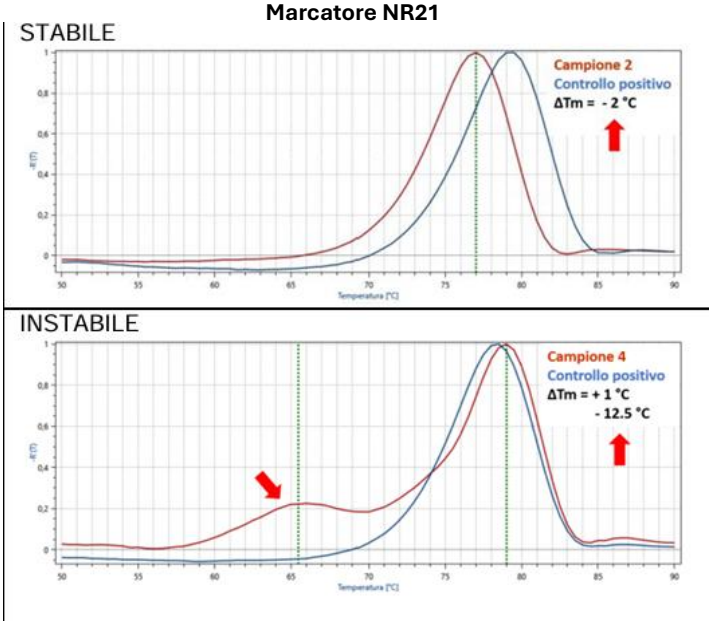

Figure 22 Curve di melting che rappresentano le condizioni stabili ed instbili del marcatore NR21

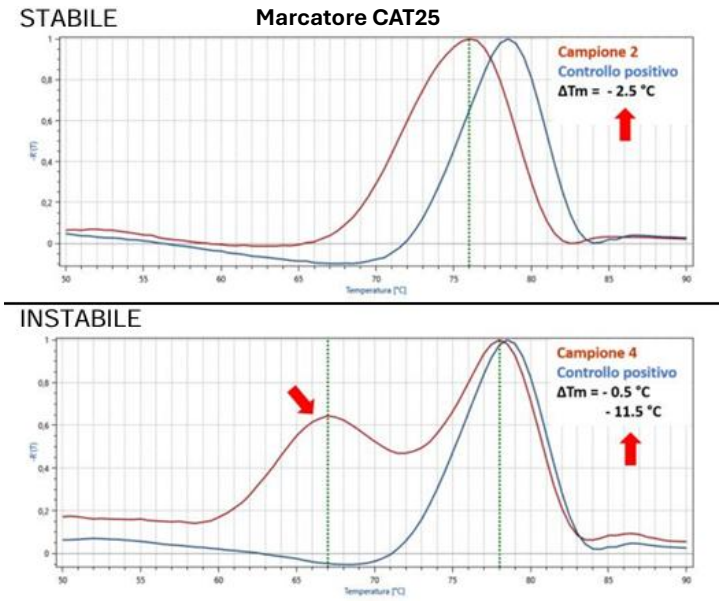

Figure 23 Curva di melting rappresentante le condizioni stabili ed instabili del marcatore CAT25

Una volta assegnati gli stati di instabilità per ogni singolo marcatore di ciascun campione, il sistema assegnerà in automatico al campione lo status di instabilità microsatellitare globale (MSS, MSI-L, MSI-H) in base al numero di marcatori identificati come instabili, come riportato nella figura:

n. marcatori instabili	Status globale di instabilità microsatellitare
0	Campione stabile (MSS)
1	Campione con bassa instabilità (MSI-L) o sotto il limite di rilevabilità del sistema
≥2	Campione con alta instabilità (MSI-H)

Figure 24 Relazione tra numero di marcatori instabili e status globale di instabilità microsatellitare

Nel caso venga rilevata l'instabilità per un singolo marcatore (MSI-L), condizione assai rara, occorre ritestare il campione tumorale parallelamente al tessuto normale o sangue dello stesso paziente, per escludere la presenza di un'instabilità a livello germinale.

Nel presente studio sono stati analizzati 44 casi di pazienti con diagnosi di neoplasie endometriali, selezionati dall'anno 2023 fino a maggio 2026. Le caratteristiche demografiche e cliniche della coorte esaminata sono riportate nei paragrafi seguenti.

3.1.Distribuzione per età

L'età media dei pazienti selezionati è risultata pari a 70,8 anni, con un intervallo compreso tra i 50 e i 95 anni.

La distribuzione dei 44 pazienti con diagnosi di carcinoma dell'endometrio mostra come la patologia sia risultata maggiormente rappresentata nelle fasce d'età più avanzate. In particolare, il numero più elevato di casi si osserva nella fascia compresa tra i 71 e gli 80 anni, che include 14 pazienti e rappresenta il 31,8% del campione totale. Seguono la fascia 61–70 anni con 12 pazienti (27,3%) e quella 51–60 anni con 10 pazienti (22,7%). Nelle età più avanzate si osserva invece una progressiva riduzione del numero di pazienti: la fascia 81–90 anni comprende 7 casi (15,9%), mentre nella fascia 91–100 anni è stato registrato un solo caso (2,3%).

Nel complesso, i dati evidenziano una maggiore concentrazione dei casi tra la sesta e l'ottava decade di vita, suggerendo come il carcinoma dell'endometrio colpisca prevalentemente donne in età post-menopausale. Questo andamento risulta coerente con quanto riportato in letteratura, secondo cui l'età avanzata rappresenta uno dei principali fattori associati allo sviluppo della neoplasia endometriale.

Dal punto di vista biologico, tale distribuzione può essere correlata ai cambiamenti endocrini che caratterizzano il periodo post-menopausale, durante il quale alterazioni dell'equilibrio ormonale, in particolare un'esposizione prolungata agli estrogeni non bilanciata dal progesterone, possono favorire processi proliferativi a livello endometriale. Inoltre, con l'avanzare dell'età aumentano frequentemente anche altri fattori di rischio associati, come obesità, diabete e sindrome metabolica, condizioni spesso correlate al carcinoma dell'endometrio.

La presenza di casi anche nelle fasce d'età più giovani suggerisce tuttavia come la patologia non sia esclusiva dell'età avanzata, ma possa manifestarsi anche prima della menopausa, sebbene con frequenza inferiore. È importante considerare, infine, che i dati presentati derivano da un campione numericamente limitato e descrivono la distribuzione osservata all'interno della popolazione analizzata, senza permettere di trarre conclusioni epidemiologiche generalizzabili alla popolazione più ampia.

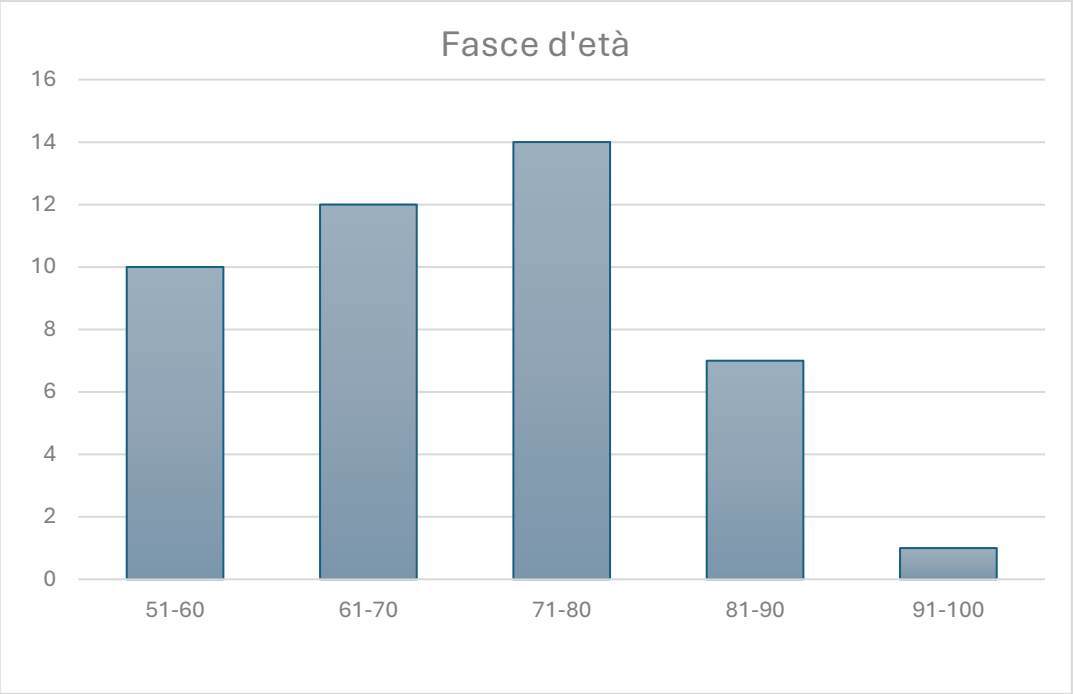

Figure 25 Distribuzione dei pazienti per fasce d'età (n=44)

3.2.Caratterizzazione istologica dei carcinomi endometriali

La distribuzione degli istotipi nei 44 pazienti analizzati evidenzia una netta predominanza della forma endometrioide, riscontrata in 35 casi e corrispondente al 79% del campione totale. Gli istotipi sierosi sono stati identificati in 6 pazienti (14%), mentre le forme miste risultano meno frequenti, con 3 casi osservati (7%).

Il dato osservato appare coerente con quanto riportato in letteratura, secondo cui l'adenocarcinoma endometrioide rappresenta l'istotipo più comune del carcinoma dell'endometrio. Questa variante è generalmente associata a un'eziologia estrogeno-correlata e tende a manifestarsi prevalentemente in donne in post-menopausa. Inoltre, rispetto agli altri istotipi, il carcinoma endometrioide presenta spesso un comportamento biologico meno aggressivo e una prognosi relativamente più favorevole, soprattutto quando diagnosticato negli stadi iniziali.

Gli istotipi sierosi, pur essendo numericamente inferiori nel campione analizzato, rivestono particolare interesse clinico per il loro comportamento generalmente più aggressivo, la maggiore tendenza alla diffusione extrauterina e la prognosi meno favorevole. Le forme miste, invece, comprendono caratteristiche istologiche appartenenti a differenti sottotipi tumorali e possono presentare una variabilità biologica e prognostica maggiore.

Nel complesso, la distribuzione osservata nel campione riflette l'eterogeneità biologica del carcinoma dell'endometrio, evidenziando la predominanza delle forme endometrioidi ma confermando al tempo stesso la presenza di istotipi meno frequenti e clinicamente più aggressivi.

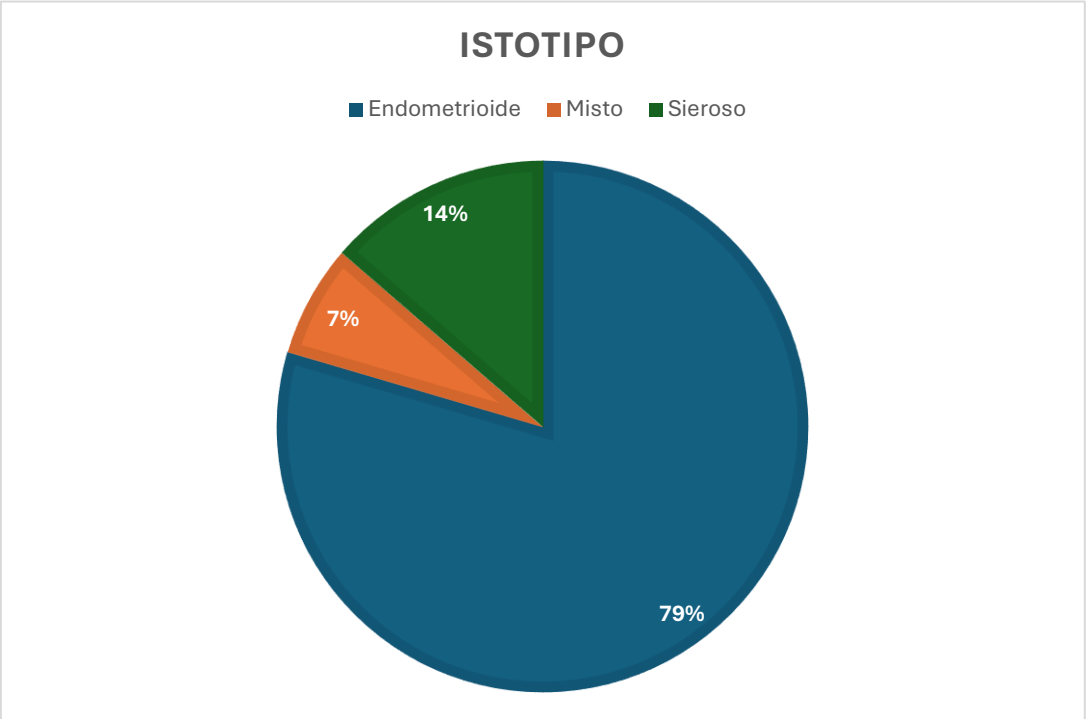

Figure 26 Istotipi del cancro dell'endometrio

3.3. Caratterizzazione MSS/MSI mediante IHC

L'analisi immunoistochimica delle proteine del sistema di mismatch repair (MMR) nei 44 campioni di carcinoma dell'endometrio ha evidenziato una distribuzione pressoché sovrapponibile tra i casi classificati come MSS (Microsatellite Stable) e MSI (Microsatellite Instability). In particolare, 22 campioni (50%) hanno mostrato un profilo MSI, mentre 21 casi (48%) sono risultati MSS. Un solo campione (2%) è stato classificato come indeterminato.

La valutazione dello stato delle proteine MMR mediante metodica immunoistochimica ha rappresentato un criterio fondamentale per la selezione dei campioni inclusi nello studio. Tutti i casi analizzati disponevano infatti di un'analisi immunoistochimica completa delle proteine coinvolte nel sistema di mismatch repair, indispensabile per la classificazione molecolare dei tumori. Al contrario, altri campioni di carcinoma dell'endometrio non sottoposti a questa metodica non sono stati inclusi nello studio, poiché privi delle informazioni necessarie per una corretta caratterizzazione del profilo MMR.

Per quanto riguarda il campione classificato come indeterminato, l'analisi immunoistochimica ha evidenziato una perdita isolata dell'espressione della proteina MSH6, mentre le altre proteine del sistema MMR risultavano conservate. Questo tipo di quadro può essere di più difficile interpretazione rispetto ai pattern classici di perdita combinata delle proteine MMR. Infatti, la perdita isolata di MSH6 può essere associata ad alterazioni specifiche del gene MSH6, ma in alcuni casi può anche riflettere

problematiche tecniche, eterogeneità tumorale oppure alterazioni biologiche non facilmente classificabili come chiaramente MSI o MSS sulla sola base immunoistochimica. Per questo motivo, il campione è stato considerato indeterminato e non inseribile con certezza in una delle due categorie principali.

La presenza di una quota elevata di casi MSI assume particolare rilevanza dal punto di vista biologico e clinico, poiché l'instabilità dei microsatelliti è associata a difetti nei geni del mismatch repair e può influenzare sia il comportamento tumorale sia la risposta terapeutica. L'identificazione del profilo MSI/MMR riveste inoltre un ruolo importante nell'inquadramento prognostico e nella possibile identificazione di pazienti candidabili a trattamenti mirati, incluse le immunoterapie.

Nel complesso, i dati ottenuti confermano l'importanza dell'analisi immunoistochimica delle proteine MMR nella caratterizzazione dei carcinomi endometriali e nella selezione dei campioni da includere nello studio.

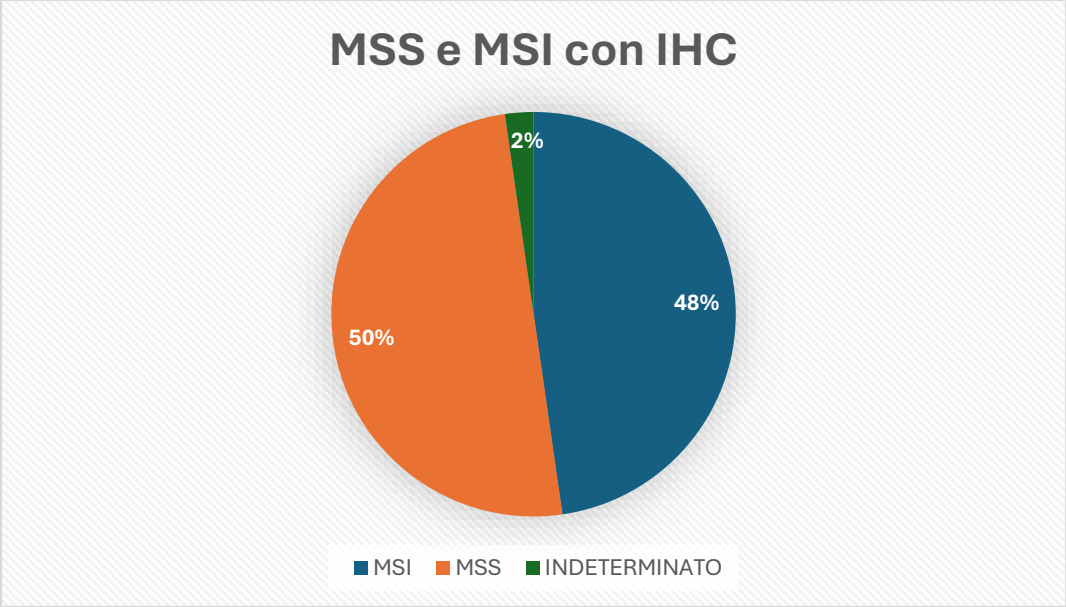

Figure 27 Analisi proteine MMR con immunoistochimica

3.4. Conferma in biologia molecolare

Nei casi in cui l'analisi immunoistochimica delle proteine del sistema MMR ha evidenziato risultati dubbi o non chiaramente interpretabili, è stata eseguita un'ulteriore analisi di conferma mediante metodiche di biologia molecolare, al fine di valutare con maggiore accuratezza la presenza di instabilità dei microsatelliti (MSI).

Come mostrato nella figura 28, tra i campioni sottoposti ad approfondimento molecolare, 10 casi sono stati confermati come MSI, mentre 7 casi non hanno mostrato conferma molecolare dell'instabilità dei microsatelliti.

Questi risultati evidenziano come l'analisi immunoistochimica rappresenti un importante strumento di screening iniziale, ma come in alcuni casi possano emergere quadri di difficile interpretazione che richiedono ulteriori approfondimenti diagnostici. La conferma mediante biologia molecolare consente infatti di aumentare l'accuratezza diagnostica, distinguendo i casi realmente associati a deficit del sistema mismatch repair da quelli in cui le alterazioni osservate all'immunoistochimica non corrispondono a una reale instabilità dei microsatelliti.

La presenza di casi non confermati sottolinea inoltre la complessità biologica del carcinoma endometriale e i limiti interpretativi che possono emergere nell'analisi immunoistochimica, soprattutto in presenza di pattern atipici o perdite proteiche isolate, tenendo conto dell'eterogeneità biologica dei tumori. Per questo motivo, l'integrazione tra immunoistochimica e biologia molecolare rappresenta un approccio fondamentale per una corretta classificazione molecolare dei tumori endometriali.

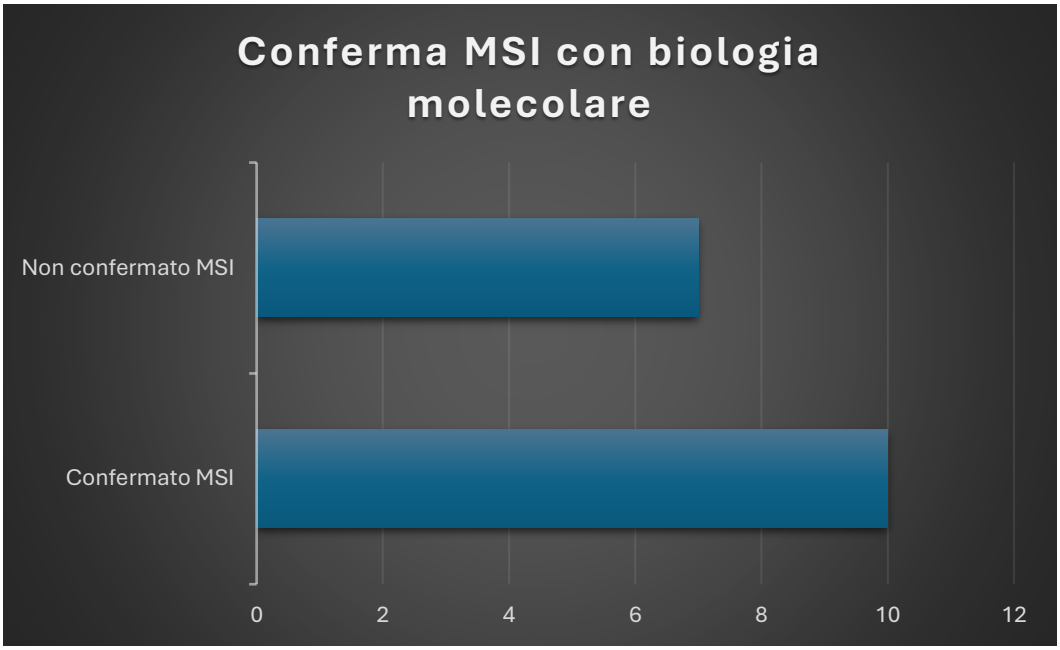

Figure 28 Conferma in biologia molecolare dei pazienti con un risultato dubbio con IHC

3.5.Confronto tra analisi immunoistochimica e biologia molecolare

Particolare attenzione è stata rivolta a 5 casi selezionati tra quelli totali, scelti accuratamente in modo che rappresentassero tutta la casistica possibile nell'ambito della valutazione dei microsatelliti nel cancro dell'endometrio.

Caso 1

Il caso clinico preso in esame riguarda una paziente di 61 anni con una diagnosi istologica di adenocarcinoma endometrioide di basso grado.
Dall'analisi immunoistochimica è emerso:

- **MLH1**: espressione conservata
- **PMS2**: espressione conservata
- **MSH2**: espressione conservata
- **MSH6**: espressione conservata

Il profilo immunoistochimico della lesione sopra descritto è compatibile con un fenotipo microsatellitare stabile (MSS).

In presenza di questi casi chiari in cui il medico patologo, nella visione al microscopio, trova un quadro con una colorazione nucleare delle cellule tumorali abbondante e in assenza di errori evidenti di colorazione o artefatti, non viene fatta l'analisi in biologia molecolare che dovrebbe confermare quanto visto nell'analisi IHC.

Caso 2

Il secondo caso analizzato riguarda una paziente di 74 anni con una diagnosi istologica di adenocarcinoma endometrioide di basso grado.
Il profilo immunoistochimico dei microsatelliti è il seguente:

- **MLH1:** perdita di espressione
- **PMS2:** perdita di espressione
- **MSH2:** espressione conservata
- **MSH6:** espressione conservata

Dall'analisi immunoistochimica è emerso che la lesione è sospetta per una neoplasia ad alta probabilità di instabilità dei microsatelliti ma non conclusivo per complesso MMR alterato, deficient Mismatich repair- sospetto dMMR, di conseguenza necessaria conferma mediante analisi molecolare.

Successivamente è stato estratto il DNA dalla componente tumorale. L'analisi molecolare è stata eseguita mediante PCR end-point con profilo di denaturazione, utilizzando il kit EasyPGX® MSI.

Sono stati analizzati i seguenti marcatori microsatellitari: BAT25, BAT26, NR21, NR22, NR24, NR27, CAT25 e MONO27. L'analisi ha evidenziato un profilo MSI-H (Microsatellite Instability – High), indicativo di un fenotipo instabile. In particolare, è stata rilevata instabilità in 4 marcatori microsatellitari su 8 analizzati, confermando la presenza di un'elevata instabilità genomica.
In questo caso, è stata osservata piena concordanza tra le due metodiche, con assenza di alterazioni rilevate sia a livello proteico (IHC) sia a livello molecolare (PCR).

Caso 3

Il terzo caso analizzato riguarda una paziente di 67 anni con diagnosi istologica di carcinoma endometriale misto (90% a componente endometrioide e 10% a cellule chiare).
Dall'analisi immunoistochimica è emerso:

- **MLH1**: espressione conservata
- **PMS2**: perdita di espressione
- **MSH2**: espressione conservata
- **MSH6**: espressione conservata

Il profilo immunoistochimico fa presupporre ad un fenotipo instabile (MSI), tuttavia la sola perdita della proteina PMS2 e non dell'intera coppia (MLH1-PMS2) richiede forzatamente la conferma in biologia molecolare.
L'analisi molecolare eseguita mediante PCR, utilizzando i marcatori BAT25, BAT26, NR21, NR22, NR24, NR27, CAT25 e MONO27, non ha confermato il profilo di instabilità microsatellitare (MSI). Non è stata rilevata alcuna instabilità in nessuno degli otto marcatori analizzati (0/8), indicando l'assenza di alterazioni nel sistema di riparazione del mismatch.
In questo caso le due metodiche discordavano tra loro, dimostrando l'utilità della biologia molecolare vista la sua precisione più elevata ma anche la complementarità tra queste due analisi, per permettere quindi la terapia più adeguata al singolo caso di questa paziente.

Caso 4

La quarta osservazione clinica riguarda una paziente di 65 anni con diagnosi istologica di adenocarcinoma endometrioide di basso grado.
L'analisi immunoistochimica ha evidenziato:

- MLH1: espressione conservata
- PMS2: espressione conservata
- MSH2: espressione conservata
- MSH6: espressione indeterminata

In questa casistica l'analisi risulta non valutabile in quanto l'espressione di una proteina è indeterminata, pertanto è necessaria l'integrazione molecolare.

A differenza di quanto emerso dall'analisi immunoistochimica, l'analisi molecolare ha evidenziato un profilo di instabilità microsatellitare (MSI), con riscontro di instabilità in 3 dei marcatori analizzati. Il quadro risultante è pertanto compatibile con un fenotipo instabile.

In questo caso l'immunoistochimica può risultare non interpretabile per motivi tecnici (ad esempio problematica di fissazione del materiale) o per ambiguità nell'espressione proteica. In tali situazioni, l'analisi molecolare rappresenta lo strumento decisivo per la diagnosi, permettendo di classificare il tumore come un fenotipo instabile (MSI) con affidabilità.

Il ricorso alla metodica PCR ha dunque un valore essenziale nei casi non conclusivi con IHC, garantendo una diagnosi certa, necessaria per l'eventuale orientamento terapeutico.

Caso 5

Il quinto caso analizzato riguarda una paziente di 60 anni con una diagnosi istologica di adenocarcinoma endometrioide di basso grado.

Dall'analisi immunoistochimica è emerso:

- **MLH1**: perdita di espressione
- **PMS2**: perdita di espressione
- **MSH2**: espressione conservata
- **MSH6**: espressione conservata

Il profilo immunoistochimico, vista la perdita della coppia delle proteine MMR MLH1/PMS2, è compatibile con un fenotipo instabile MSI.

Per ulteriore conferma è stata effettuata l'analisi con la biologia molecolare, che però ha evidenziato un fenotipo stabile (MSS). Non è stata evidenziata alcuna instabilità in tutti gli 8 marcatori analizzati.

Questo risultato contrastante tra le due metodiche ha portato ad un ulteriore approfondimento del caso mediante la valutazione della metilazione di MLH1, che è la causa principale della perdita di espressione di questa proteina, che essendo il promoter della coppia (MLH1/PMS2) porterebbe ad una perdita dell'intera coppia, con conseguente fenotipo instabile (MSI).

L'analisi effettuata ha evidenziato la metilazione di MLH1, pertanto si evince la necessità di una valutazione genetica, al fine di studiare nel modo più corretto possibile questo caso.

Casi	Età	Risultato IHC	Risultato biologia molecolare	Concordanza
1	61	pMMR	Non effettuata	----
2	74	dMMR	MSI-H	SI
3	67	Sospetto (perdita di PMS2)	MSS	NO
4	65	Non valutabile	MSI	PCR risolutiva
5	60	dMMR	MSS (effettuata anche per conferma eventuale metilazione MLH1)	NO, necessaria correlazione genetica vista presenza di metilazione MLH1

Tabella 1 Confronto tra IHC e biologia molecolare

4. DISCUSSIONE

Il presente lavoro si inserisce nel contesto della progressiva integrazione tra diagnosi istopatologica tradizionale e caratterizzazione molecolare del carcinoma dell'endometrio.

Negli ultimi anni, infatti, la classificazione del carcinoma endometriale non si basa più esclusivamente su istotipo, grado istologico e stadio di malattia, ma richiede una valutazione più complessa, capace di includere anche specifici biomarcatori molecolari. Tra questi, l'instabilità dei microsatelliti e il deficit del sistema di mismatch repair rappresentano elementi di particolare rilievo, sia per il valore diagnostico e prognostico, sia per le implicazioni terapeutiche e genetico-familiari.

Lo scopo principale di questa tesi è stato valutare il ruolo dell'immunoistochimica e delle tecniche di biologia molecolare nell'identificazione dell'instabilità dei microsatelliti nei tumori dell'endometrio, con particolare attenzione al grado di concordanza tra le due metodiche e alle situazioni in cui esse non risultavano sovrapponibili.

Il lavoro nasce dall'esperienza di tirocinio svolta presso l'Ospedale Universitario IRCCS "SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria, dove è stata condotta un'analisi comparativa tra immunoistochimica e biologia molecolare nella valutazione dello stato MSI/MMR. L'obiettivo non è stato soltanto descrivere il funzionamento tecnico delle metodiche, ma comprenderne il significato applicativo nella pratica diagnostica quotidiana.

Dall'analisi complessiva emerge che l'immunoistochimica rappresenta un metodo estremamente utile come primo approccio diagnostico. Essa consente di valutare l'espressione delle principali proteine del sistema MMR, ovvero MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6, permettendo di individuare eventuali perdite di espressione compatibili con un deficit del sistema di riparazione del DNA. I vantaggi principali dell'immunoistochimica sono la rapidità di esecuzione, il costo relativamente contenuto, la disponibilità nella maggior parte dei laboratori di anatomia patologica e la possibilità di interpretare il risultato direttamente nel contesto morfologico del tessuto tumorale. Per questi motivi, essa viene considerata un test di riferimento nello screening iniziale del carcinoma endometriale.

Tuttavia, i risultati ottenuti mostrano anche che l'immunoistochimica non può essere considerata una tecnica infallibile. La sua interpretazione può essere influenzata da diversi fattori, tra cui la qualità della fissazione del tessuto, la presenza di artefatti, l'intensità della colorazione, la rappresentatività della componente tumorale e la corretta valutazione del controllo interno. In particolare, alcuni quadri possono risultare dubbi o non chiaramente interpretabili, come nel caso di colorazioni deboli, perdite proteiche parziali, pattern atipici o espressioni indeterminate. In queste condizioni, il solo dato immunoistochimico rischia di non essere sufficiente per classificare correttamente il tumore.

Proprio per questo motivo, la biologia molecolare assume un ruolo fondamentale come metodica di conferma. A differenza dell'immunoistochimica, che valuta indirettamente il funzionamento del

sistema MMR attraverso l'espressione proteica, l'analisi molecolare indaga direttamente la presenza di instabilità nei microsatelliti. Questo permette di stabilire se il tumore presenti effettivamente un fenotipo MSI, aumentando l'accuratezza diagnostica nei casi dubbi o discordanti. Nel presente lavoro, tra i campioni sottoposti ad approfondimento molecolare, 10 casi sono stati confermati come MSI, mentre 7 casi non hanno mostrato conferma molecolare dell'instabilità dei microsatelliti. Questo dato è particolarmente significativo, perché dimostra che non tutte le alterazioni osservate con l'immunoistochimica corrispondono necessariamente ad una reale instabilità microsatellitare.

La presenza di casi non confermati suggerisce che alcune alterazioni immunoistochimiche possano derivare da problematiche tecniche o interpretative, piuttosto che da un autentico deficit funzionale del sistema MMR. Questo aspetto è rilevante perché una classificazione errata potrebbe avere conseguenze cliniche importanti. Definire un tumore come dMMR/MSI-H significa infatti orientare il percorso diagnostico e terapeutico in una precisa direzione, con possibili ricadute sulla scelta del trattamento, sull'eventuale indicazione all'immunoterapia e sull'attivazione di percorsi di consulenza genetica per sospetta sindrome di Lynch.

L'analisi dei casi selezionati conferma ulteriormente la complementarità tra le due metodiche. Nel primo caso, caratterizzato da espressione conservata di tutte le proteine MMR, il profilo immunoistochimica risultava con un fenotipo MSS. In situazioni di questo tipo, quando la colorazione nucleare è chiara, ben evidente e supportata da un controllo interno adeguato, l'immunoistochimica può essere sufficiente per orientare la classificazione del campione, senza necessità immediata di approfondimento molecolare.

Diversa è la situazione osservata nel secondo caso, in cui la perdita di espressione di MLH1 e PMS2 ha suggerito un sospetto fenotipo dMMR. L'analisi molecolare ha confermato il profilo MSI-H, questo rappresenta un esempio di concordanza tra immunoistochimica e biologia molecolare: la perdita proteica osservata con IHC trova conferma nell'instabilità rilevata mediante PCR. In questi casi, le due metodiche si rafforzano reciprocamente, consentendo una classificazione più solida.

Il terzo caso, invece, mostra una situazione più problematica. La perdita isolata di PMS2, in presenza di conservazione delle altre proteine MMR, ha fatto ipotizzare un possibile fenotipo instabile, ma l'analisi molecolare non ha confermato la presenza di MSI, non rilevando instabilità in nessuno dei marcatori analizzati. Questo dato evidenzia come una perdita proteica isolata possa non corrispondere sempre ad una reale instabilità dei microsatelliti. In tale contesto, la biologia molecolare diventa decisiva per evitare una sovrastima dei casi MSI e per impedire che una paziente venga inserita in un percorso diagnostico-terapeutico non pienamente giustificato dal profilo molecolare del tumore.

Anche il quarto caso appare significativo perché mostra un limite opposto dell'immunoistochimica: non tanto un falso sospetto di instabilità, quanto una difficoltà interpretativa dovuta ad un'espressione

indeterminata di una delle proteine analizzate. In questa situazione, l'IHC da sola non permette di giungere a una classificazione certa. L'approfondimento molecolare ha invece evidenziato un profilo MSI, dimostrando che la PCR può chiarire casi nei quali il dato immunoistochimico risulti ambiguo o non valutabile. Questo conferma che la biologia molecolare non deve essere considerata soltanto una metodica di secondo livello, ma uno strumento essenziale in tutti i casi in cui il risultato immunoistochimico non sia pienamente affidabile.

Nel complesso, i dati ottenuti indicano che immunoistochimica e biologia molecolare non devono essere interpretate come metodiche alternative, perché sarebbe riduttivo pensare di sostituire l'una con l'altra. Piuttosto, esse svolgono ruoli diversi ma integrati: l'immunoistochimica è particolarmente adatta come test di screening iniziale, perché rapida, accessibile e sostenibile mentre la biologia molecolare è molto utile come conferma nei casi dubbi, discordanti o non interpretabili, perché fornisce una valutazione diretta dell'instabilità dei microsatelliti.

Questa integrazione tra le due metodiche ha un valore concreto nella medicina di precisione. Nel carcinoma dell'endometrio, la classificazione molecolare non ha soltanto un significato descrittivo, ma contribuisce alla stratificazione prognostica e alla scelta terapeutica. I tumori dMMR/MSI-H tendono ad accumulare numerose mutazioni, generando nuovi antigeni che possono renderli più riconoscibili dal sistema immunitario. Questo spiega la maggior sensibilità di tali tumori agli inibitori dei checkpoint immunitari, come pembrolizumab e dostarlimab, già discussi nel capitolo introduttivo della tesi. Una corretta identificazione dello stato MSI/MMR diventa quindi indispensabile per selezionare le pazienti che potrebbero beneficiare di strategie terapeutiche mirate.

Un ulteriore elemento di rilievo riguarda la sindrome di Lynch, poiché il carcinoma endometriale può rappresentare un tumore sentinella di questa sindrome ereditaria, spesso prima ancora dell'insorgenza di altre neoplasie associate. Per questo motivo, individuare correttamente un deficit del sistema MMR non significa soltanto caratterizzare il tumore della singola paziente, ma anche riconoscere un possibile rischio genetico familiare. Una diagnosi sospetta può infatti condurre a consulenza genetica, test germinali e programmi di sorveglianza per i familiari. Questo amplia il valore clinico dell'analisi MSI/MMR, che non resta confinata alla gestione oncologica individuale, ma assume anche un ruolo preventivo.

Questo lavoro ovviamente deve tenere conto di alcuni limiti che riguardano:

- Numerosità del campione, che non permette di trarre conclusioni statisticamente generalizzabili. Il dato ottenuto è comunque utile sul piano osservazionale e applicativo, perché riflette una casistica reale di laboratorio e mostra concretamente quali problematiche possano emergere nella routine diagnostica

- Casi sottoposti a conferma molecolare: non tutti i campioni analizzati con immunoistochimica sono stati rivalutati mediante biologia molecolare, ma solo quelli dubbi o non chiaramente interpretabili
- L'immunoistochimica conserva per sua natura una componente interpretativa legata all'esperienza dell'operatore e alla qualità del preparato. Anche la biologia molecolare, pur essendo più oggettiva nell'identificazione dell'instabilità dei marcatori, non è priva di criticità in quanto richiede materiale tumorale adeguato, quindi una sufficiente quantità e qualità di DNA, richiede tecniche più complesse e costi maggiori, pertanto anche la PCR deve essere inserita all'interno di un percorso diagnostico controllato e standardizzato

Alla luce di questi aspetti, il risultato più importante del presente lavoro non è stabilire la superiorità assoluta di una metodica sull'altra, ma la necessità di creare un algoritmo diagnostico integrato in cui l'immunoistochimica può essere utilizzata come test di primo livello per tutti i carcinomi endometriali, mentre la biologia molecolare può essere riservata ai casi con perdita proteica atipica, espressione dubbia, controllo interno non ottimale, risultati discordanti o sospetto clinico-familiare non coerente con il dato immunoistochimico. Questo approccio consente di coniugare sostenibilità economica, rapidità diagnostica e accuratezza molecolare.

5. CONCLUSIONI

Lo svolgimento di questo lavoro ha permesso di approfondire uno degli aspetti più attuali della patologia oncologica moderna: il progressivo passaggio da una diagnostica basata prevalentemente sulle caratteristiche morfologiche del tumore a una valutazione sempre più integrata con le informazioni molecolari.

Il carcinoma dell'endometrio rappresenta un esempio particolarmente significativo di questa trasformazione. Se in passato la definizione del rischio clinico si basava principalmente sull'istotipo, sul grado di differenziazione e sullo stadio della malattia, oggi la comprensione dei meccanismi molecolari alla base della cancerogenesi consente una caratterizzazione molto più approfondita della neoplasia. In questo contesto, lo studio del sistema del mismatch repair e dell'instabilità microsatellitare ha modificato in maniera sostanziale l'approccio diagnostico e clinico a questa patologia.

L'esperienza svolta durante il tirocinio ha evidenziato come dietro un risultato diagnostico apparentemente semplice esiste in realtà un processo complesso che coinvolge competenze multidisciplinari, tecnologie differenti e una continua integrazione tra osservazione morfologica e dati molecolari. Questo aspetto ha permesso di comprendere concretamente come la diagnostica moderna non possa più essere considerata una successione di tecniche isolate, ma debba essere interpretata come un percorso in cui ogni informazione contribuisce alla costruzione del quadro clinico complessivo della paziente.

Uno degli elementi più interessanti emersi durante la realizzazione di questa tesi è stato osservare come il valore di un test diagnostico non dipenda esclusivamente dalla sua accuratezza tecnica, ma soprattutto dalla sua capacità di fornire informazioni utili per la gestione clinica del paziente. L'identificazione delle alterazioni del sistema MMR non rappresenta infatti un semplice dato laboratoristico, ma un'informazione che può influenzare il percorso terapeutico, il follow-up e, in alcuni casi, l'intera storia clinica di una famiglia.

Questo lavoro ha inoltre evidenziato il ruolo sempre più centrale della medicina di precisione nell'ambito oncologico. La crescente disponibilità di biomarcatori e di terapie mirate sta progressivamente trasformando il concetto stesso di diagnosi, che non si limita più a identificare una malattia, ma tende a definirne le specifiche caratteristiche biologiche. In quest'ottica, il laboratorio non rappresenta soltanto un supporto alla pratica clinica, ma diventa parte integrante nel processo decisionale terapeutico.

Dal punto di vista personale e formativo, l'attività svolta ha rappresentato un'importante occasione per comprendere il ruolo del biologo all'interno del percorso diagnostico oncologico. L'osservazione

diretta delle procedure laboratoristiche e l'approfondimento della letteratura scientifica hanno permesso di acquisire una maggiore consapevolezza dell'importanza che la diagnostica molecolare riveste nella medicina contemporanea e delle prospettive future che essa potrà offrire.

In definitiva, il principale insegnamento emerso da questo lavoro è che la crescente conoscenza dei meccanismi biologici alla base delle neoplasie sta rendendo possibile un approccio sempre più personalizzato alla cura del paziente. Il carcinoma dell'endometrio rappresenta oggi uno dei modelli più significativi di questa evoluzione e dimostra come l'integrazione tra ricerca scientifica, innovazione tecnologica e pratica clinica possa tradursi in un miglioramento concreto della qualità della diagnosi e dell'assistenza sanitaria.

6. BIBLIOGRAFIA

Addante, Francesca, Antonio d'Amati, Angela Santoro, et al. 2024. «Mismatch Repair Deficiency as a Predictive and Prognostic Biomarker in Endometrial Cancer: A Review on Immunohistochemistry Staining Patterns and Clinical Implications». *International Journal of Molecular Sciences* 25 (2): 1056. https://doi.org/10.3390/ijms25021056.

Ali, Aus Tariq. 2014. «Reproductive Factors and the Risk of Endometrial Cancer». *International Journal of Gynecological Cancer* 24 (3): 384–93. https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000075.

Amato, Martina, Renato Franco, Gaetano Facchini, et al. 2022. «Microsatellite Instability: From the Implementation of the Detection to a Prognostic and Predictive Role in Cancers». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (15): 8726. https://doi.org/10.3390/ijms23158726.

Berek, Jonathan S., Xavier Matias-Guiu, Carien Creutzberg, et al. 2023. «FIGO Staging of Endometrial Cancer: 2023». *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 162 (2): 383–94. https://doi.org/10.1002/ijgo.14923.

Buhtoiarova, Tatiana N., Carol A. Brenner, e Meenakshi Singh. 2016. «Endometrial Carcinoma: Role of Current and Emerging Biomarkers in Resolving Persistent Clinical Dilemmas». *American Journal of Clinical Pathology* 145 (1): 8–21. https://doi.org/10.1093/ajcp/aqv014.

Cirisano, Frank D., Stanley J. Robboy, Richard K. Dodge, et al. 2000. «The Outcome of Stage I–II Clinically and Surgically Staged Papillary Serous and Clear Cell Endometrial Cancers When Compared with Endometrioid Carcinoma». *Gynecologic Oncology* 77 (1): 55–65. https://doi.org/10.1006/gyno.2000.5737.

Concin, Nicole, Xavier Matias-Guiu, Ignace Vergote, et al. 2021. «ESGO/ESTRO/ESP Guidelines for the Management of Patients with Endometrial Carcinoma». *International Journal of Gynecological Cancer* 31 (1): 12–39. https://doi.org/10.1136/ijgc-2020-002230.

Epstein, E., C. Van Holsbeke, F. Mascilini, et al. 2011. «Gray-Scale and Color Doppler Ultrasound Characteristics of Endometrial Cancer in Relation to Stage, Grade and Tumor Size». *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 38 (5): 586–93. https://doi.org/10.1002/uog.9038.

Galant, Natalia, Paweł Krawczyk, Marta Monist, et al. 2024. «Molecular Classification of Endometrial Cancer and Its Impact on Therapy Selection». *International Journal of Molecular Sciences* 25 (11): 5893. https://doi.org/10.3390/ijms25115893.

Hu, Rong, Leena Hilakivi-Clarke, e Robert Clarke. 2015. «Molecular Mechanisms of Tamoxifen-Associated Endometrial Cancer (Review)». *Oncology Letters* 9 (4): 1495–501. https://doi.org/10.3892/ol.2015.2962.

Karpel, Hannah, Brian Slomovitz, Robert L. Coleman, e Bhavana Pothuri. 2023. «Biomarker-Driven Therapy in Endometrial Cancer». *International Journal of Gynecological Cancer* 33 (3): 343–50. https://doi.org/10.1136/ijgc-2022-003676.

Kommoss, S., M. K. McConechy, F. Kommoss, et al. 2018. «Final Validation of the ProMisE Molecular Classifier for Endometrial Carcinoma in a Large Population-Based Case Series». *Annals of Oncology* 29 (5): 1180–88. https://doi.org/10.1093/annonc/mdy058.

Kopatsaris, Stergios, Ioannis Tsakiridis, Georgios Kapetanios, et al. 2024. «Management of Endometrial Cancer: A Comparative Review of Guidelines». *Cancers* 16 (21): 3582. https://doi.org/10.3390/cancers16213582.

Kuhn, Theresa M., Saeeda Dhanani, e Sarfraz Ahmad. 2023. «An Overview of Endometrial Cancer with Novel Therapeutic Strategies». *Current Oncology (Toronto, Ont.)* 30 (9): 7904–19. https://doi.org/10.3390/curroncol30090574.

Li, Kai, Haiqing Luo, Lianfang Huang, Hui Luo, e Xiao Zhu. 2020. «Microsatellite Instability: A Review of What the Oncologist Should Know». *Cancer Cell International* 20: 16. https://doi.org/10.1186/s12935-019-1091-8.

Luchini, C., F. Bibeau, M. J. L. Ligtenberg, et al. 2019. «ESMO Recommendations on Microsatellite Instability Testing for Immunotherapy in Cancer, and Its Relationship with PD-1/PD-L1 Expression and Tumour Mutational Burden: A Systematic Review-Based Approach». *Annals of Oncology* 30 (8): 1232–43. https://doi.org/10.1093/annonc/mdz116.

Luo, J., S. Beresford, C. Chen, et al. 2014. «Association between Diabetes, Diabetes Treatment and Risk of Developing Endometrial Cancer». *British Journal of Cancer* 111 (7): 1432–39. https://doi.org/10.1038/bjc.2014.407.

Mahdy, Heba, Elsa S. Vadakekut, e David Crotzer. 2025. «Endometrial Cancer». In *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525981/.

Makker, Vicky, Helen MacKay, Isabelle Ray-Coquard, et al. 2021. «Endometrial Cancer». *Nature Reviews. Disease Primers* 7 (1): 88. https://doi.org/10.1038/s41572-021-00324-8.

Manfredi, Riccardo, Paoletta Mirk, Giulia Maresca, et al. 2004. «Local-Regional Staging of Endometrial Carcinoma: Role of MR Imaging in Surgical Planning». *Radiology* 231 (2): 372–78. https://doi.org/10.1148/radiol.2312021184.

Oaknin, A., T. J. Bosse, C. L. Creutzberg, et al. 2022. «Endometrial Cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for Diagnosis, Treatment and Follow-Up». *Annals of Oncology* 33 (9): 860–77. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.05.009.

Onstad, Michaela A., Rosemarie E. Schmandt, e Karen H. Lu. 2016. «Addressing the Role of Obesity in Endometrial Cancer Risk, Prevention, and Treatment». *Journal of Clinical Oncology* 34 (35): 4225–30. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.69.4638.

Patel, Seema. 2018. «Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), an Inflammatory, Systemic, Lifestyle Endocrinopathy». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 182 (settembre): 27–36. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.04.008.

Rabban, Joseph T., C. Blake Gilks, Anais Malpica, et al. 2019. «Issues in the Differential Diagnosis of Uterine Low-Grade Endometrioid Carcinoma, Including Mixed Endometrial Carcinomas: Recommendations from the International Society of Gynecological Pathologists». *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 38 Suppl 1 (Iss 1 Suppl 1): S25–39. https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000512.

Savelli, L., M. Ceccarini, M. Ludovisi, et al. 2008. «Preoperative Local Staging of Endometrial Cancer: Transvaginal Sonography vs. Magnetic Resonance Imaging». *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 31 (5): 560–66. https://doi.org/10.1002/uog.5295.

Soslow, Robert A., John P. Bissonnette, Andrew Wilton, et al. 2007. «Clinicopathologic Analysis of 187 High-Grade Endometrial Carcinomas of Different Histologic Subtypes: Similar Outcomes Belie Distinctive Biologic Differences». *The American Journal of Surgical Pathology* 31 (7): 979–87. https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31802ee494.

Suga, Tsuyoshi, Yuji Nakamoto, Tsuneo Saga, et al. 2011. «Clinical Value of FDG-PET for Preoperative Evaluation of Endometrial Cancer». *Annals of Nuclear Medicine* 25 (4): 269–75. https://doi.org/10.1007/s12149-011-0474-2.

Tafe, Laura J., Karuna Garg, Ivy Chew, Carmen Tornos, e Robert A. Soslow. 2010. «Endometrial and Ovarian Carcinomas with Undifferentiated Components: Clinically Aggressive and Frequently Underrecognized Neoplasms». *Modern Pathology* 23 (6): 781–89. https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.41.

Zhao, Shuangshuang, Lingli Chen, Yuqin Zang, et al. 2022. «Endometrial Cancer in Lynch Syndrome». *International Journal of Cancer* 150 (1): 7–17. https://doi.org/10.1002/ijc.33763.

Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM). *Linee guida italiane sulle neoplasie dell'utero: endometrio e cervice*, 2025. Disponibile all'indirizzo: https://www.aiom.it/linee-guida-aiom-2024-neoplasie-dellutero-endometrio-e-cervice/

7. RINGRAZIAMENTI

Come molti ben sanno non sono una persona di molte parole, soprattutto quando riguarda l'esprimere le mie emozioni, ma mi sembra doveroso dire qualcosa per la conclusione del mio percorso universitario.

Inizio ringraziando la mia relatrice, Prof.ssa Valeria Magnelli, per la sua costante disponibilità e per il supporto fondamentale. Grazie per aver risposto ad ogni domanda con grande competenza e attenzione.

Un ringraziamento di cuore va anche alla dr.ssa Paola Re, che mi ha permesso di svolgere il tirocinio presso il laboratorio di Anatomia Patologica dell'ospedale di Alessandria. Fin dal primo giorno mi sono sentito accolto, sia dal punto di vista professionale che umano. La dr.ssa Re ha partecipato attivamente nella pianificazione e nella stesura della tesi rispondendo ad ogni mio dubbio e dimostrandosi molto disponibile e presente.

Ora passiamo alle persone che fanno parte della mia vita.

Un profondo ringraziamento ai miei genitori, per il supporto costante e incondizionato che non mi hanno fatto mai mancare. Grazie per avermi dato la possibilità di studiare e per aver sempre fatto il tifo per me. Un grazie speciale anche a mia sorella Matilde, non c'è bisogno che aggiunga altro, sai quanto sei importante per me quanto ti voglia bene.

Un sentito grazie anche ai miei nonni, sapere di contare sempre sul vostro sostegno è stata una costante durante tutto il mio percorso.

Un pensiero speciale va a mia nonna Lina: purtroppo non sei riuscita a vedere il mio percorso all'università perché te ne sei andata troppo presto, però so che hai fatto il tifo per me. Spero di averti reso fiera di questo mio traguardo.

Ai miei amici dell'università, ormai diventati amici per la vita, Filippo, Pampa e Giorgio: grazie per le ore passate sui libri e, soprattutto, per i momenti di cazzeggio (decisamente più di quelle studiate). Grazie per tutti i soprannomi cattivissimi che abbiamo rifilato alla gente e che hanno fatto volare questi due anni come se fossero durati cinque minuti. In università eravamo una presenza fissa, un gruppo unico al pari degli One Direction e delle Spice Girls: non a caso ci chiamano "i Pinguini di Madagascar" o "le quattro parti del neurone"... che se non sono tutte insieme, semplicemente non connettono!

Ai miei migliori amici Simone, Pietro e Mandri, la mia seconda famiglia: grazie per tutti i momenti di cazzeggio, le risate fino alle lacrime e i giudizi cattivissimi (ma meritati) sguinzagliati verso il resto del mondo. Grazie per esserci sempre, per sopportarmi ogni giorno e per dimostrarmi che, qualunque cosa succeda nella vita, insieme continueremo sempre a fare un caos tremendo.

Infine, grazie a me stesso: per la pazienza e per non aver mollato mai, ma il meglio deve ancora arrivare. Ora possiamo andare a festeggiare!