

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE "AMEDEO AVOGADRO"



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA

Corso di Laurea Magistrale in Biologia

curriculum Biomedico-Biomolecolare

ELABORATO FINALE

**Profilo immunitario e infiammatorio sistemico nel carcinoma
mammario: caratterizzazione delle cellule mieloidi soppressorie
e delle popolazioni T senescenti ed esauste in relazione alla
risposta alla terapia neoadiuvante.**

Relatore: Prof.ssa Chiara Porta



Firmato digitalmente da Chiara Porta
Data: 05.10.2026 17:33:46 CEST
Organizzazione: UNIVERSITA' DEGLI
STUDI DEL PIEMONTE
ORIENTALE/01943490027

Correlatore: Prof.ssa Alessandra Gennari

Tutor: Dott.ssa Veronica Martini

Candidata: Arianna Sicignano

Matricola: 20035701

Anno accademico 2025/2026

Abstract

Il carcinoma mammario è caratterizzato da una marcata eterogeneità biologica e clinica, che si riflette nella variabilità della risposta alla terapia neoadiuvante (NAT). In questo contesto, la caratterizzazione dello stato immunitario e infiammatorio sistemico può contribuire all'identificazione di potenziali biomarcatori di risposta. In particolare, l'analisi delle cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC), dei linfociti T con fenotipo senescente (TSen) o esausto (TExh) e delle citochine IL-6 e TNF- α permette di esplorare aspetti della regolazione immunitaria e dell'infiammazione potenzialmente associati alla risposta terapeutica.

Questa tesi si inserisce nello studio clinico NEOMET, volto a valutare il potenziale effetto dell'esercizio fisico e della supplementazione con acidi grassi polinsaturi omega-3 a lunga catena sulla risposta alla NAT nelle pazienti con carcinoma mammario operabile. Lo studio prevede che le pazienti candidate a NAT vengano randomizzate in quattro bracci: braccio A, NAT standard e raccomandazioni generali sullo stile di vita; braccio B, NAT e supplementazione con omega-3; braccio C, NAT ed esercizio fisico supervisionato; braccio D, NAT associata alla combinazione dei due interventi.

L'obiettivo della tesi è stato caratterizzare le sottopopolazioni circolanti di TSen, TExh e MDSC, mediante citometria, e quantificare i livelli plasmatici di IL-6 e TNF- α , mediante tecnologia Luminex. Sono state incluse 39 pazienti, con valutazioni previste al basale, dopo due cicli di terapia (T1) e al termine della NAT (EOT).

Non sono emerse differenze statisticamente significative attribuibili agli interventi; la limitata numerosità dei campioni disponibili riduce tuttavia la solidità di questa valutazione. Al basale, abbiamo dimostrato che (I) la frequenza dei TExh era significativamente maggiore nelle pazienti che hanno raggiunto la risposta patologica completa (pCR); (II) una correlazione inversa tra la frequenza delle PMN-MDSC e i livelli di TNF- α ; (III) una correlazione positiva tra IL-6 e TNF- α . Dopo due cicli di terapia è stata rilevata una diminuzione delle frequenze di TSen e TExh, che anche se non ha raggiunto la significatività statistica, suggerisce l'interesse di approfondire le variazioni precoci di queste popolazioni. Nel complesso, i risultati non consentono ancora di attribuire un valore prognostico o predittivo affidabile ai biomarcatori analizzati, né di dimostrare un effetto aggiuntivo della supplementazione con DHA/EPA e dell'esercizio fisico rispetto alla NAT, comune a tutti i bracci. La caratterizzazione dei biomarcatori circolanti costituisce tuttavia una base per approfondirne il coinvolgimento nella risposta al trattamento e valutare il possibile ruolo degli interventi sullo stile di vita nella modulazione del sistema immunitario.

INDICE

Introduzione.....	5
1. Cancro al seno	5
1.1 Patogenesi e classificazione clinica	6
1.2 Sottotipi molecolari del cancro al seno	9
1.3 Fattori di rischio	11
1.4 Approcci terapeutici: terapia locale e sistemica.....	13
1.4.1 Chemioterapia neoadiuvante (NAC) e risposta patologica completa (pCR).....	15
1.5 Sistema immunitario nel cancro.....	16
1.6 Senescenza cellulare e le complesse dinamiche del fenotipo secretorio associato alla senescenza (SASP)	18
1.6.1 Il SASP: la sua duplice funzione nel microambiente tumorale	18
1.6.2 Immunosenescenza: la connessione tra T-cell Exhaustion e p16ink4α.....	19
1.7 Myeloid-Derived Suppressor cells (MDSCs)	19
1.7.1 Meccanismi d'azione: la strategia della deplezione dei nutrienti .	21
1.7.2 Significato clinico e valore prognostico.....	21
1.8 Linfociti T senescenti (TSEN) e linfociti T esausti (TEXH).....	22
1.9 Infiammazione sistemica nel cancro	22
2. Scopo dell'elaborato.....	24
3. Materiali e metodi	25
3.1 Disegno dello studio e arruolamento dei pazienti (NEOMET)	25
3.2 Criteri di eleggibilità	25
3.3 Randomizzazione e divisione in bracci.....	25
3.4 Procedura di raccolta e trasporto dei campioni biologici.....	26
3.5 Isolamento delle cellule mononucleate del sangue periferico (PMBCs)	26
3.6 Citofluorimetria	28
3.6.1 Caratterizzazione linfociti T senescenti (Tsen) ed esausti (Texh) mediante citometria a flusso	32

3.6.2 Immunofenotipizzazione delle cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC).....	35
3.7 MILLIPLEX® Multiplex Immunoassay di IL6 e TNF- α mediante tecnologia Luminex®.....	36
3.7.1 Acquisizione dei dati.....	39
3.7.2 Controllo della qualità analitica	40
3.8 Analisi statistiche	41
4. Risultati.....	42
4.1 Descrizione della popolazione in studio	42
4.2 Strategia di gating per la caratterizzazione di linfociti T senescenti ed esausti.....	44
4.3 Strategia di gating delle MDSCs.....	46
4.4 Disponibilità dei dati per i marker analizzati.....	48
4.5 Caratterizzazione delle popolazioni cellulari circolanti.....	50
4.5.1 Caratterizzazione di M-MDSC e PMN-MDSC in relazione al timepoint e al braccio di studio	50
4.5.2 Caratterizzazione dei linfociti T senescenti (Tsen) e T esausti (Texh) in relazione al timepoint e al braccio di studio	52
4.5.3 Caratterizzazione di linfociti T CD4+ e CD8+ per singoli bracci	56
4.6 Analisi della frequenza delle sottopopolazioni cellulari in base alla risposta patologica.....	57
4.7 Dosaggi di interleuchina-6 (IL-6) e TNF-alpha.....	58
4.7.1 Valutazione delle correlazioni tra le cellule T senescenti ed esauste, MDSC e livelli plasmatici di IL-6 e TNFa	60
4.7.2 Analisi della correlazione tra i biomarcatori in base alla risposta al trattamento.....	63
5. Discussione	64
6. Conclusioni.....	71
7. Bibliografia	72

INTRODUZIONE

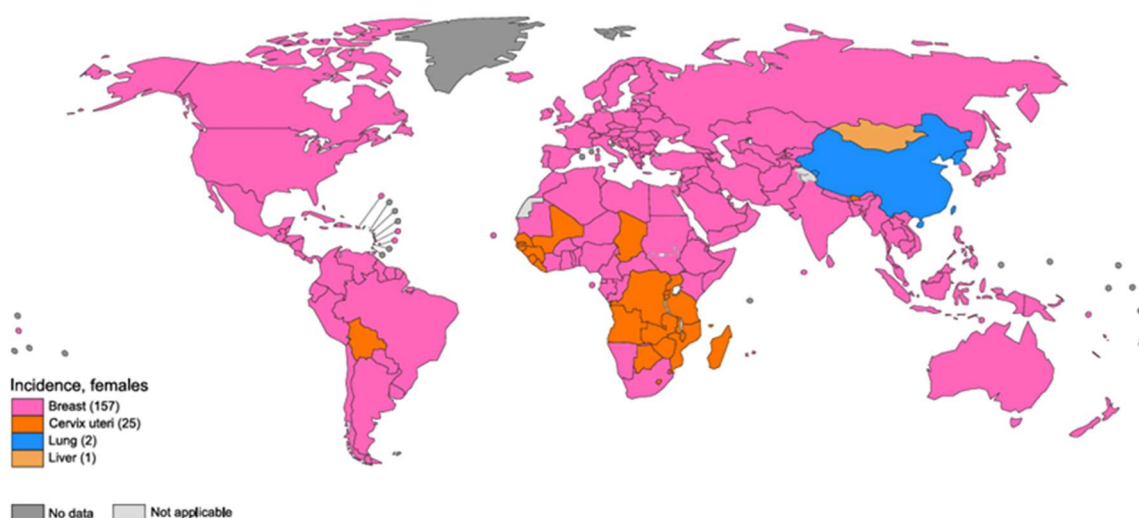
1. Cancro al seno

Il cancro al seno (*Breast Cancer*) rimane una delle principali sfide per la salute pubblica globale ed è il tumore più frequentemente diagnosticato tra le donne in tutto il mondo, con circa 2,3 milioni di nuovi casi e circa 670.000 decessi registrati a livello mondiale nel 2022 (*American Cancer Society*, 2024).

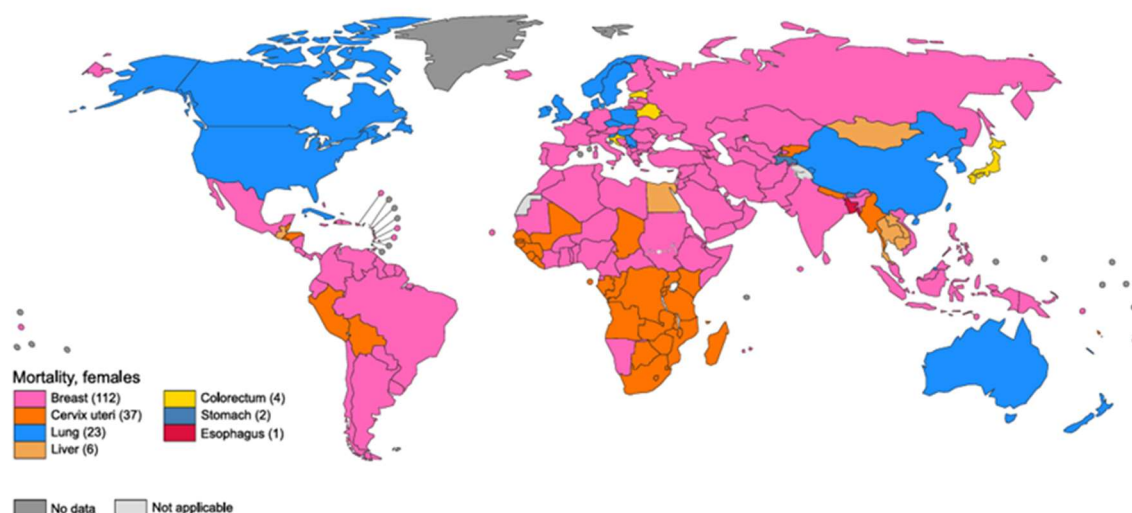
Negli Stati Uniti, il cancro al seno rappresenta quasi il 30% di tutti i tumori recentemente diagnosticati nelle donne, con stime attuali che indicano che circa 1 donna su 8 svilupperà un cancro al seno invasivo nel corso della vita, a fronte di circa 1 uomo su 1.000 nel 2022 (*American Cancer Society*, 2024; *Siegel et al.*, 2023).

L'incidenza aumenta progressivamente con l'età: la maggior parte delle nuove diagnosi interessa donne di età pari o superiore a 40 anni, mentre i tassi più elevati si osservano nella popolazione femminile di età superiore ai 70 anni nel 2022 (*American Cancer Society*, 2024).

Nonostante l'elevata incidenza, negli Stati Uniti la mortalità associata al carcinoma mammario si è significativamente ridotta negli ultimi decenni. Dalla fine degli anni Ottanta, i tassi di mortalità sono diminuiti di oltre il 40%, principalmente grazie ai progressi nella diagnosi precoce, alla diffusione dei programmi di screening e al miglioramento delle terapie sistemiche (*Berry et al.*, 2005; *Siegel et al.*, 2023).



(A)



(B)

Figura 1: Tipi di cancro più comuni per Paese nelle donne per incidenza (A) e mortalità (B) nel 2022, basato sui dati dei registri nazionali dei tumori e su dati statistici. Ogni colore rappresenta il tipo di cancro con l'incidenza più alta o il maggior numero di decessi in quel Paese. Adattato da Ferlay et al., 2024 (stime GLOBOCAN 2022) (Bray et al., 2024).

1.1 Patogenesi e classificazione clinica

I meccanismi precisi alla base dello sviluppo del cancro al seno non sono ancora completamente chiariti; tuttavia, le evidenze attuali descrivono un processo a più fasi che coinvolge l'accumulo progressivo di alterazioni genetiche ed epigenetiche nelle cellule mammarie normali o dei precursori (Hanahan e Weinberg, 2011). Questi cambiamenti molecolari possono alterare le principali reti di segnalazione che regolano la proliferazione, la sopravvivenza, la differenziazione e la migrazione cellulare, promuovendo così la trasformazione oncogenica. Tra le vie più frequentemente implicate nella tumorigenesi mammaria ci sono Wnt/ β -catenina, la segnalazione delle chinasi dipendenti da ciclina (CDK), NOTCH e l'asse PI3K/AKT/mTOR, tutte comunemente alterate nei diversi sottotipi di cancro al seno (Hanahan e Weinberg, 2011). Il cancro al seno può nascere da distinti compartimenti anatomici e cellulari all'interno della mammella, compresi l'epitelio duttale, l'epitelio lobulare o il tessuto stromale circostante. Di conseguenza, le neoplasie mammarie vengono ampiamente classificate in carcinomi e sarcomi in base alla loro origine cellulare (World Health Organization, 2019).

I carcinomi, che hanno origine dalle cellule epiteliali che rivestono i dotti e i lobuli, rappresentano la stragrande maggioranza dei tumori al seno, mentre i sarcomi, derivati dal compartimento stromale mesenchimale, rappresentano meno dell'1% dei casi (World Health Organization, 2019).

Dal punto di vista anatomopatologico e clinico, il carcinoma mammario può essere classificato, in base al grado di diffusione della malattia, in: carcinoma non invasivo (in situ), carcinoma invasivo e carcinoma metastatico (Figura 2) (Amin et al., 2017).

Il carcinoma in situ è caratterizzato da cellule epiteliali maligne confinate ai dotti o ai lobuli senza invasione attraverso la membrana basale. Queste lesioni sono classificate come carcinoma duttale in situ (DCIS) o carcinoma lobulare in situ (LCIS) (Amin et al., 2017). Al contrario, il cancro al seno invasivo è definito dalla rottura della membrana basale, che permette alle cellule maligne di infiltrare il tessuto circostante, presentandosi più comunemente come carcinoma duttale invasivo (IDC) o carcinoma lobulare invasivo (ILC) (Amin et al., 2017). Il cancro al seno metastatico si distingue per la diffusione ai linfonodi regionali, in particolare i linfonodi ascellari, o organi distanti come ossa, fegato, polmoni e cervello, che solitamente derivano dalla progressione di patologie non trattate o trattate.

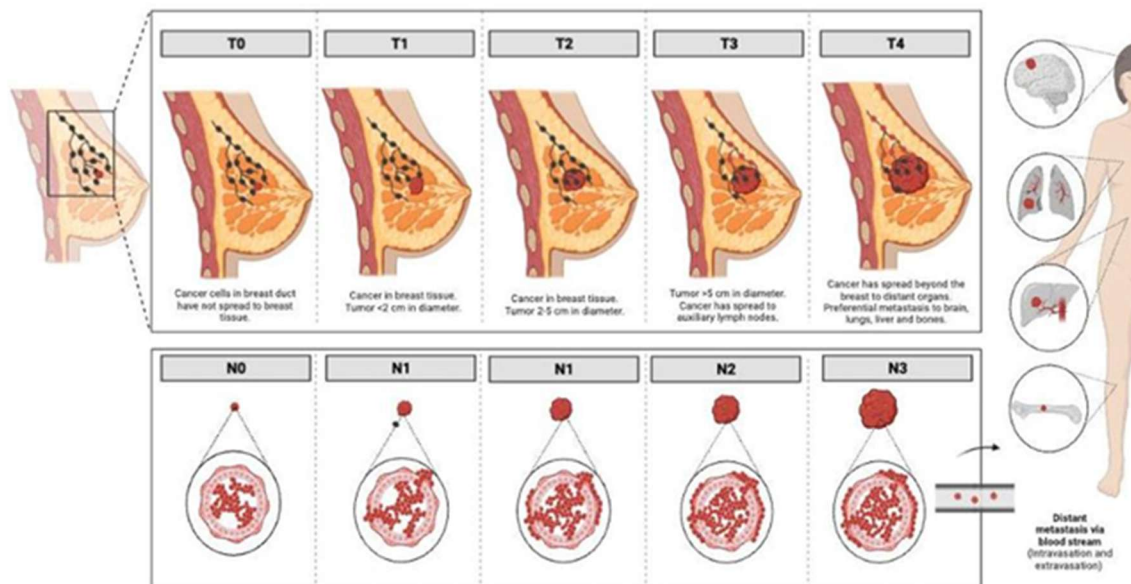


Figura 2: Rappresentazione schematica della progressione del cancro al seno dalle forme non invasive (stadio 0) attraverso gli stadi invasivi (I–III) fino alla malattia metastatica (stadio IV). Adattato da Martin-García D, Téllez T, Redondo M, García-Aranda M. Calcium Homeostasis in the Development of Resistant Breast Tumors. Cancers.2023. Figura creata con BioRender.com.

Clinicamente, l'estensione anatomica del cancro al seno è descritta utilizzando il sistema di stadiazione *Tumor-Node-Metastasis* (TNM), che classifica la malattia dallo stadio 0 allo stadio IV in base alle dimensioni del tumore, al coinvolgimento dei linfonodi e alla presenza di metastasi a distanza (Tabella 1) (Amin et al., 2017; Gradishar et al., 2023).

- Lo stadio 0 corrisponde a una malattia non invasiva confinata ai dotti o ai lobuli, comprendendo le lesioni in situ;
- Lo stadio I definisce il cancro al seno invasivo precoce con dimensioni tumorali limitate e coinvolgimento linfonodale minimo o assente;
- Lo stadio II include tumori invasivi associati a diffusione regionale a uno-tre linfonodi ascellari;
- Lo stadio III rappresenta una malattia localmente avanzata, caratterizzata da un coinvolgimento linfonodale più esteso, tipicamente quattro o più linfonodi ascellari o diffusione ai linfonodi mammari interni, senza evidenza di metastasi a distanza;
- Lo stadio IV indica cancro al seno metastatico, definito dalla diffusione a organi distanti e corrispondente a una designazione M1 nel sistema TNM (Tabella 1) (Gradishar et al., 2023; World Health Organization, 2019).

Tabella 1: Stadiazione anatomica del cancro al seno secondo il sistema di classificazione TNM, mostrando la corrispondenza tra lo stadio complessivo (0-IV) e le dimensioni del tumore (T), il coinvolgimento dei linfonodi regionali (N) e le metastasi a distanza (M).

STADIO COMPLESSIVO	CATEGORIA T	CATEGORIA N	CATEGORIA M
Stadio 0	Tis	No	Mo
Stadio I	T1	No	Mo
Stadio IIA	T0	N1	Mo
	T1	N1	Mo
	T2	No	Mo
Stadio IIB	T2	N1	Mo
	T3	No	Mo
Stadio IIIA	T0	N2	Mo
	T1	N2	Mo
	T2	N2	Mo
	T3	N1	Mo
	T3	N2	Mo
Stadio IIIB	T4	Qualsiasi N	Mo
Stadio IIIC	Qualsiasi T	N3	Mo
Stadio IV	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1

Oltre alla stadiazione anatomica, la classificazione moderna del cancro al seno integra ulteriori caratteristiche clinicopatologiche e molecolari, inclusi il grado istologico e lo stato dei recettori ormonali (recettore degli estrogeni [ER], recettore del progesterone [PR]), l'espressione di HER2 e i risultati di saggi di espressione multigenica (*National Comprehensive Cancer Network, 2023*). Anche i fattori legati al paziente come età, stato menopausale, storia familiare, densità mammaria, razza ed etnia sono presi in considerazione nelle decisioni cliniche.

Tutte queste variabili definiscono uno stadio prognostico clinico individualizzato, che serve come base per guidare le strategie terapeutiche iniziali e stimare quelli che saranno gli esiti (*Amin et al., 2017; Gradishar et al., 2023*).

1.2 Sottotipi molecolari del cancro al seno

Il cancro al seno è una malattia eterogenea dal punto di vista biologico, patologico e clinico, che richiede un approccio di classificazione integrato che combini caratteristiche molecolari, patologiche e legate al paziente. La caratterizzazione clinica contemporanea incorpora caratteristiche specifiche del tumore come il grado istologico, l'attività mitotica, la necrosi, l'espressione dei recettori ormonali (recettore degli estrogeni [ER] e recettore del progesterone [PR]), lo stato di HER2, l'indice di proliferazione Ki-67 e i risultati dei saggi di espressione multigenica, insieme a fattori legati al paziente tra cui età, status menopausale, storia familiare, densità mammografica del seno e razza o etnia (*National Comprehensive Cancer Network, 2023; Harbeck et al., 2019*).

Dal punto di vista della patologia molecolare, il cancro al seno è attualmente categorizzato in cinque principali sottotipi intrinseci (Figura 3): luminale A, luminale B/HER2-negativo, luminale B/HER2-positivo, HER2-enrichito e cancro al seno triplo negativo (TNBC). Essi si basano principalmente sull'espressione di ER, PR, HER2 e Ki-67, come definito dal *St. Gallen International Consensus* e stato incorporato nelle linee guida cliniche europee e nazionali (*Goldhirsch et al., 2013; Harbeck et al., 2019*).

- I tumori **Luminal A**, caratterizzati da una forte espressione di ER e PR, negatività per HER2 e bassa attività proliferativa, rappresentano il sottotipo più diffuso e sono associati a un comportamento indolente e a una prognosi favorevole;

- I tumori **Luminal B**, che rappresentano circa il 20-30% dei casi, mostrano tassi di proliferazione più elevati e possono essere HER2-negativi o HER2-positivi, conferendo un rischio maggiore di recidiva rispetto ai tumori Luminal A (*Goldhirsch et al., 2013; Harbeck et al., 2019*);
- Il sottotipo **HER2-enriched**, definito dalla sovraespressione di HER2 in assenza di recettori ormonali, comprende circa il 10-15% dei tumori al seno ed è associato a una biologia tumorale aggressiva, anche se i risultati sono notevolmente migliorati con l'introduzione delle terapie mirate contro HER2 (*Goldhirsch et al., 2013*);
- Il carcinoma mammario **triplo negativo**, caratterizzato dalla mancanza di espressione di ER, PR e HER2 e tipicamente da alti livelli di Ki-67, rappresenta circa il 15% dei casi ed è associato con età più giovane alla diagnosi, predisposizione genetica, diffusione metastatica precoce e tassi di recidiva più elevati; è importante sottolineare che il TNBC rappresenta un'entità biologicamente diversificata che comprende più sottogruppi molecolari oltre all'assenza dei marcatori biologici classici (*Goldhirsch et al., 2013; Perou et al., 2000*).

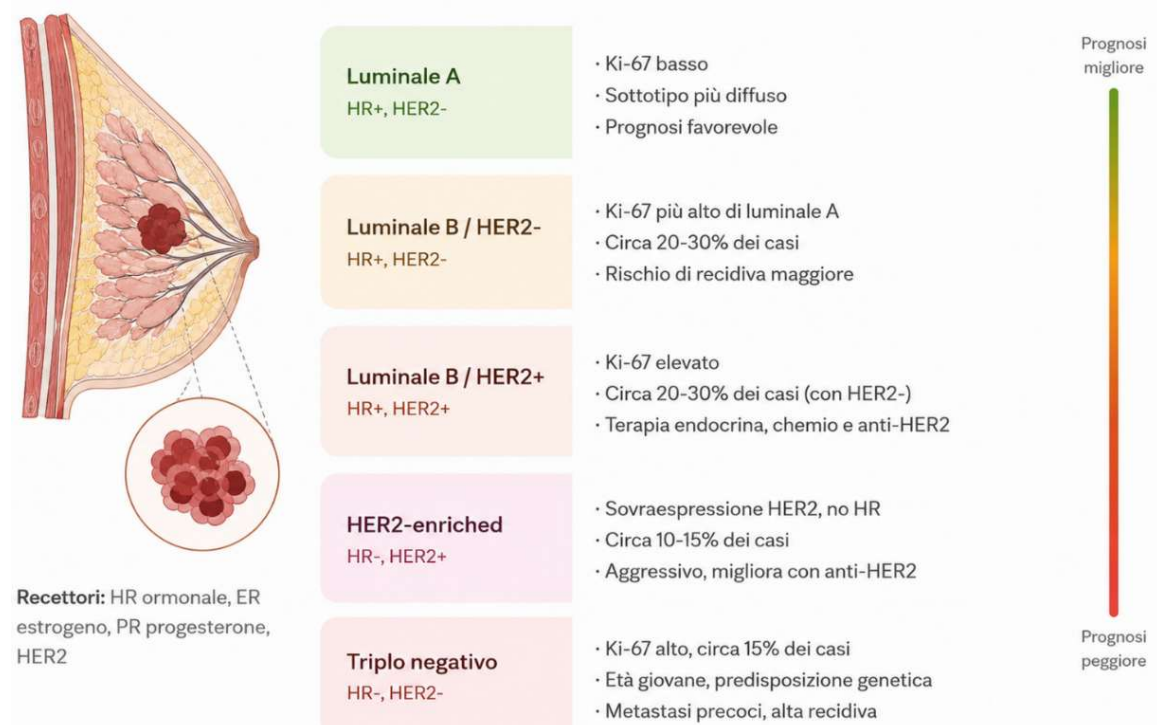


Figura 3: Panoramica schematica dei cinque principali sottotipi intrinseci (molecolari) del cancro al seno che mostrano luminale A, luminale B (HER2- e HER2 +), HER2-enriched e triplo-negativo (*Wawruszak et al., 2021*). Immagine generata con la piattaforma Claude.

Complessivamente, l'integrazione dello stadio anatomico, delle caratteristiche patologiche, del sottotipo molecolare, del profilo multigenico e dei fattori specifici del paziente, consente di assegnare uno stadio clinico e prognostico più raffinato, che serve come base per la stratificazione individuale del rischio e guida le decisioni terapeutiche iniziali (*Perou et al., 2000*).

1.3 Fattori di rischio

Il rischio di cancro al seno deriva da un'interazione multifattoriale tra suscettibilità genetica e fattori non genetici. Una minoranza dei casi, circa il 5-10%, è attribuibile a una predisposizione ereditaria, in particolare alle varianti patologiche nei geni oncosoppressori ad alta penetrazione BRCA1 e BRCA2, i cui portatori sperimentano un rischio significativamente maggiore di sviluppare la malattia. Inoltre, le mutazioni in altri geni ad alta e moderata penetrazione, tra cui TP53, PTEN, PALB2, ATM, CHEK2 e geni correlati alla riparazione del DNA, contribuiscono ulteriormente al rischio di cancro al seno ereditario (*Kuchenbaecker et al., 2017*).

I progressi nel sequenziamento di nuova generazione hanno reso possibili i test su pannelli multigenici e lo sviluppo di punteggi di rischio poligenico, che integrano l'effetto cumulativo di più varianti per migliorare la stratificazione del rischio individuale, anche se la loro implementazione clinica di routine rimane limitata (*Kuchenbaecker et al., 2017*).

Tabella 2: Principali fattori di rischio genetici e non genetici associati al cancro al seno.

CATEGORIA	FATTORI DI RISCHIO
● Geni ad alta penetranza	BRCA1, BRCA2
● Geni a penetranza moderata	PALB2, TP53, PTEN, ATM, CHEK2
● Fattori demografici	Sesso femminile, età avanzata
● Fattori ormonali e riproduttivi	Menarca precoce, menopausa tardiva, nulliparità, prima gravidanza tardiva, allattamento limitato
● Fattori legati a stile di vita e metabolismo	Obesità, dieta, terapia ormonale sostitutiva

I fattori di rischio non genetici giocano un ruolo altrettanto importante e comprendono elementi demografici, ormonali, riproduttivi e legati allo stile di vita. Il sesso femminile e l'aumento dell'età rappresentano i fattori di rischio epidemiologici più forti, mentre l'incidenza del cancro al seno è influenzata anche dallo sviluppo socioeconomico. I fattori ormonali e riproduttivi, che riflettono in gran parte l'esposizione cumulativa agli estrogeni durante la vita, includono la comparsa precoce del menarca, menopausa tardiva, nulliparità, età avanzata al primo parto e allattamento limitato (*Colditz e Bohlke, 2014; Kuchenbaecker et al., 2017*).

Contributi aggiuntivi comprendono l'uso della terapia ormonale sostitutiva, l'obesità soprattutto dopo la menopausa e i modelli alimentari, tutti costantemente associati a un rischio maggiore di cancro al seno. L'insieme della predisposizione genetica e i fattori di rischio modificabili e non modificabili costituiscono la base degli attuali modelli di valutazione del rischio e delle strategie preventive (*Colditz e Bohlke, 2014; Kuchenbaecker et al., 2017*).

1.4 Approcci terapeutici: terapia locale e sistemica

Le strategie terapeutiche per il cancro al seno sono personalizzate in base allo stadio della malattia, alla biologia del tumore e ai fattori legati al paziente, con obiettivi diversi nel contesto non metastatico rispetto a quello metastatico. Nelle malattie precoci e localmente avanzate, il trattamento mira a ottenere un controllo loco-regionale e ridurre il rischio di recidiva a distanza di tempo, mentre nel cancro al seno metastatico gli obiettivi principali sono prolungare la sopravvivenza e alleviare i sintomi (*Cortazar et al., 2014; Gradishar et al., 2023*).

La **terapia locale-regionale** rappresenta il fulcro della gestione del cancro al seno in fase iniziale e include la resezione chirurgica del tumore primario con valutazione dei linfonodi ascellari, spesso seguita da radioterapia adiuvante. Le opzioni chirurgiche comprendono la mastectomia e la chirurgia conservativa del seno (BCS), con diversi studi randomizzati che hanno dimostrato una sopravvivenza a lungo termine equivalente quando la BCS è combinata con la radioterapia in pazienti adeguatamente selezionate. La scelta tra gli approcci chirurgici dipende dalle dimensioni e dall'estensione del tumore, dai risultati radiologici, dall'idoneità alla radioterapia e preferenze del paziente (*Cortazar et al., 2014; Gradishar et al., 2023*).

- **Interventi chirurgici:** la Chirurgia Conservativa del Seno (BCS), o lumpectomia, consiste nell'asportazione della lesione primaria con un margine oncologico chiaro. Al contrario, la mastectomia rimane indicata per malattie multifocali o in base alle preferenze del paziente e al rischio genetico (ad esempio, portatori di BRCA). Secondo le linee guida AIOM 2024/2025, la BCS è lo standard preferito per i pazienti in Stadio I e II, a condizione che sia seguita da radioterapia adiuvante per ridurre il rischio di recidiva locale.

- **Radioterapia:** la radioterapia post-operatoria è fondamentale per eliminare i residui microscopici. Tuttavia, l'efficacia delle radiazioni ionizzanti risulta essere sempre più come modulata dal microambiente dell'ospite. Dati risalenti al 2025 suggeriscono che uno stato sistemico "pro-infiammatorio", caratterizzato da alte citochine circolanti, può ostacolare i meccanismi di riparazione tissutale e promuovere una nicchia radioresistente, sottolineando la necessità di una stabilità metabolica durante il periodo di radioterapia (*Dengxiong et al., 2025; Liu et al. 2025*).

La **terapia sistemica** consiste in farmaci in grado di raggiungere le cellule tumorali in tutto il corpo e può essere somministrata in modalità preoperatoria (neoadiuvante),

postoperatoria (adiuvante) o in entrambe le situazioni per eliminare le micrometastasi o ridurre lo stadio dei tumori prima dell'intervento chirurgico. La scelta del trattamento sistemico è guidata dal sottotipo molecolare e include terapia endocrina, terapia mirata e chemioterapia (*Gradishar et al., 2023*).

- La **terapia endocrina** rappresenta il trattamento sistemico principale per il tumore al seno positivo per i recettori ormonali e agisce contrastando la crescita tumorale stimolata dagli estrogeni; consiste tipicamente in farmaci anti-estrogeni per via orale somministrati per almeno cinque anni, con la possibilità di estendere il trattamento nei pazienti ad alto rischio di recidiva. Il Tamoxifene può essere utilizzato sia in pazienti in premenopausa sia in postmenopausa e funziona come modulatore selettivo dei recettori per estrogeni, inibendo competitivamente il legame degli estrogeni al recettore estrogenico, mentre gli inibitori dell'aromatasi riducono i livelli sistemici di estrogeni sopprimendo la sintesi periferica di estrogeni e sono preferenzialmente usati nelle donne in postmenopausa. Nelle fasi avanzate della malattia, l'aggiunta di inibitori CDK4/6 alla terapia endocrina ha migliorato significativamente i risultati clinici ritardando o superando la resistenza endocrina (*Gradishar et al., 2023*). L'oncologia moderna sta esplorando la "sensibilizzazione metabolica" di questi tumori: l'implementazione di una dieta che imita il digiuno (*Fasting mimicking diet*) ha mostrato risultati promettenti nel ridurre i livelli sistemici di insulina e IGF-1, noti per favorire la resistenza endocrina, ri-sensibilizzando potenzialmente le cellule HR+ alla privazione ormonale (*Caffà et al, 2020*).
- La **target therapy** ha migliorato profondamente i risultati nel carcinoma mammario HER2-positivo, per il quale gli agenti raccomandati includono trastuzumab, pertuzumab, trastuzumab emtansine e neratinib. Trastuzumab e pertuzumab sono anticorpi monoclonali umanizzati con meccanismi d'azione complementari: il trastuzumab inibisce la scissione del recettore HER2 e il segnalamento a valle, mentre il pertuzumab previene la dimerizzazione di HER2, in particolare con i membri della famiglia EGFR, risultando in un blocco più efficace delle vie oncogeniche e nell'induzione della citotossicità cellulare mediata da anticorpi.
- La **chemioterapia**, nonostante i progressi nei trattamenti endocrini e mirati, resta un componente fondamentale nella gestione del carcinoma mammario, specialmente nei pazienti con malattia in stadio I-III e come principale opzione sistemica per il carcinoma mammario triplo negativo. Le antracicline e i taxani sono comunemente usati come agenti

chemioterapici di prima linea; le antracicline si intercalano nel DNA e inibiscono l'enzima topoisomerasi II, mentre i taxani si legano ai microtubuli impedendone la depolimerizzazione, interrompendo quindi la mitosi e inducendo la morte cellulare apoptotica (*Cortazar et al. 2014; Gradishar et al., 2023*).

1.4.1 Chemioterapia neoadiuvante (NAC) e risposta patologica completa (pCR)

Nella fase iniziale del cancro al seno non metastatico, la chirurgia è tradizionalmente considerata l'approccio terapeutico principale; tuttavia, potrebbe non rappresentare la strategia iniziale ottimale per tutti i pazienti, soprattutto per quelli con malattia allo stadio II-III (*Cortazar et al. 2014*).

In questo contesto, la chemioterapia neoadiuvante (NAC), chiamata anche terapia sistemica neoadiuvante, offre diversi vantaggi clinici, tra cui la riduzione delle dimensioni del tumore nel seno e nell'ascella, un aumento della probabilità di interventi di conservazione del seno e una minore necessità di dissezione completa dei linfonodi ascellari, senza compromettere i risultati di sopravvivenza a lungo termine.

Inoltre, la NAC permette una valutazione in vivo della sensibilità del tumore alla terapia sistemica, consentendo la personalizzazione del trattamento e facilitando le decisioni terapeutiche post-neoadiuvante (*Cortazar et al. 2014; Gianni et al., 2011*).

L'obiettivo clinico principale della chemioterapia neoadiuvante (NAC) è il raggiungimento della risposta patologica completa (pCR), definita come l'assenza di malattia invasiva residua sia nel seno sia nei linfonodi ascellari (ypT0/Tis ypN0). Secondo le attuali linee guida AIOM e internazionali, il raggiungimento della pCR è fortemente associato a un miglioramento della sopravvivenza libera da malattia e della sopravvivenza complessiva, e la sua rilevanza prognostica è particolarmente evidente nei casi di carcinoma mammario triplo negativo (TNBC) e nei sottotipi negativi per recettori ormonali/HER2-positivi (*Cortazar et al. 2014; Gradishar et al., 2023*).

Tuttavia, l'effetto prognostico della pCR vale a livello individuale ("per paziente") ma non a livello di protocollo chemioterapico ("per trial").

I regimi standard di NAC consistono tipicamente in chemioterapia sequenziale a base di antracicline e taxani; tuttavia, strategie di intensificazione specifiche per sottotipo hanno mostrato benefici aggiuntivi. Nel carcinoma mammario HER2-positivo, il doppio blocco di HER2 con trastuzumab e pertuzumab aumenta significativamente i tassi di pCR rispetto alla sola chemioterapia, mentre nel TNBC l'aggiunta di agenti a base di platino come il carboplatino ha dimostrato efficacia nel migliorare la pCR, specialmente nei pazienti con mutazioni BRCA1/2, sebbene a costo di una maggiore tossicità. Di conseguenza, la NAC è attualmente raccomandata dal *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) e dal *St. Gallen International Expert Consensus Panel* è considerato lo standard di cura favorito per i pazienti con cancro al seno HER2-positivo o triplo negativo (Cortazar et al. 2014; Gradishar et al., 2023).

1.5 Sistema immunitario nel cancro

Il sistema immunitario svolge un ruolo centrale nello sviluppo del cancro, nella sua progressione e nella risposta alla terapia, interagendo continuamente con le cellule tumorali e con il microambiente circostante [16]. In condizioni fisiologiche, la sorveglianza immunitaria permette il riconoscimento e l'eliminazione delle cellule trasformate attraverso meccanismi immunitari innati e adattativi; tuttavia, i tumori possono sfuggire al controllo immunitario sfruttando le vie di regolazione del sistema immunitario, portando a tolleranza immunitaria e progressione della malattia (Dunn et al., 2006). Questa interazione dinamica tra cancro e sistema immunitario è descritta dal concetto di *immunoediting* del cancro, che comprende tre fasi: eliminazione, equilibrio ed evasione (Dunn et al., 2006).

- 1) Durante l'**eliminazione**, le cellule effettrici immunitarie innate e adattative riconoscono e distruggono le cellule tumorali emergenti;
- 2) Nella fase di **equilibrio**, le cellule tumorali residue sono contenute ma non eradicato, portando a una dormienza tumorale mediata dal sistema immunitario;
- 3) Infine, nella fase di **evasione**, la pressione immunitaria selettiva favorisce varianti tumorali capaci di sfuggire al riconoscimento immunitario o di sopprimere attivamente l'immunità antitumorale, risultando in una malattia clinicamente evidente (Dunn et al., 2006).

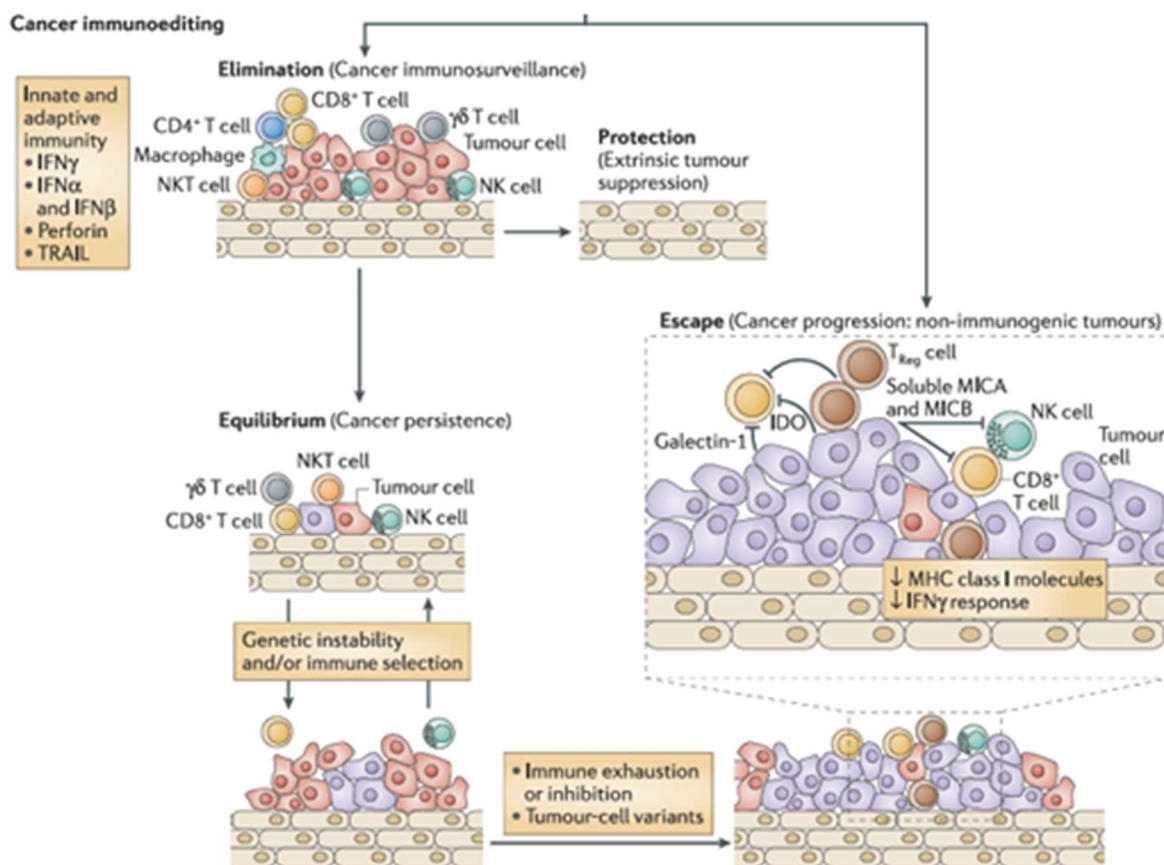


Figura 4: Rappresentazione schematica dell'immunomodulazione del cancro che illustra le fasi sequenziali di eliminazione, equilibrio ed evasione, evidenziando le interazioni dinamiche tra le cellule tumorali e le risposte immunitarie innate e adattative. Adattato da Dunn G, Koebel C, Schreiber R. Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nat Rev Immunol. 2006; 6:836-848 (Dunn et al., 2006).

All'interno del microambiente tumorale, le cellule immunitarie come i linfociti T, i linfociti B, le cellule natural killer, i macrofagi e le cellule dendritiche esercitano sia effetti antitumorali che protumorali, a seconda del loro stato funzionale e dell'organizzazione spaziale (Fridman et al., 2012; Galluzzi et al., 2017a).

L'infiammazione cronica, l'attivazione dei checkpoint immunitari e l'espansione delle popolazioni cellulari immunosoppressive contribuiscono alla progressione tumorale limitando le risposte immunitarie efficaci. Allo stesso tempo, la presenza, la composizione e l'orientamento funzionale delle cellule immunitarie infiltranti il tumore sono risultati come importanti biomarcatori prognostici e predittivi in diversi tipi di cancro, incluso il cancro al seno (Fridman et al., 2012; Galluzzi et al., 2017b).

È importante notare che le terapie anticancro influenzano profondamente il sistema immunitario. Trattamenti convenzionali come la chemioterapia e la radioterapia possono

indurre la morte cellulare immunogenica, migliorare la presentazione degli antigeni e rimodellare le popolazioni di cellule immunitarie, modulando così l'immunità antitumorale oltre ai loro effetti citotossici diretti (*Fridman et al., 2012*). Più recentemente, il successo clinico delle immunoterapie, in particolare degli inibitori dei checkpoint immunitari, ha messo in evidenza il potenziale terapeutico di ripristinare o potenziare il controllo dei tumori mediato dal sistema immunitario.

L'insieme di queste osservazioni sottolinea il ruolo fondamentale del sistema immunitario, non solo nell'inizio e nella progressione dei tumori, ma anche come fattore chiave nell'efficacia delle terapie, fornendo quindi una ragione per studiare specifici sottogruppi di cellule immunitarie, come le cellule B, e il loro ruolo funzionale nel cancro al seno.

1.6 Senescenza cellulare e le complesse dinamiche del fenotipo secretorio associato alla senescenza (SASP)

La senescenza cellulare è un programma biologico sofisticato caratterizzato da un'uscita stabile e irreversibile dal ciclo cellulare. Questo stato viene attivato da una vasta gamma di stress, inclusa l'attrizione progressiva dei telomeri, spesso chiamata la "bussola biologica", così come la disfunzione metabolica, i danni genotossici e l'attivazione anomala degli oncogeni. Nel contesto clinico del cancro al seno, la senescenza è spesso una conseguenza non intenzionale degli interventi terapeutici, come la radioterapia ionizzante e la chemioterapia citotossica, o perfino da una carenza localizzata di nutrienti nel microambiente tumorale (*Campisi e D'Adda di Fagagna, 2007; Di Micco et al., 2021*). A differenza delle cellule apoptotiche, le cellule senescenti restano vive e molto resistenti sia agli stimoli mitogeni sia ai segnali di morte programmata, subendo un'espansione morfologica profonda, un rimodellamento epigenomico e cambiamenti metabolici (*Coppé et al., 2010; Wang et al., 2024*).

1.6.1 Il SASP: la sua duplice funzione nel microambiente tumorale

Sebbene le cellule senescenti smettano di proliferare, rimangono metabolicamente iperattive, sviluppando uno stato funzionale unico noto come Fenotipo Secretorio Associato alla Senescenza (SASP). Il SASP è una potente "fabbrica chimica" che secerne una complessa miscela di citochine pro-infiammatorie (come IL-6 e IL-1 β), chemochine, fattori

di crescita e metalloproteasi della matrice (MMP). La composizione specifica di questo secretoma è molto eterogenea, determinata dal fattore di stress primario e dal tipo cellulare originale (*Gorgoulis et al., 2013; He e Sharpless, 2017*).

L'impatto biologico del SASP è paradossale: in un contesto fisiologico acuto, svolge un ruolo benefico nel rimodellamento dei tessuti e nella guarigione delle ferite reclutando cellule immunitarie per eliminare componenti danneggiati. In ambito oncologico, la senescenza agisce inizialmente come una solida barriera soppressiva dei tumori, fermando la trasformazione maligna delle cellule pre-neoplastiche. Tuttavia, l'accumulo cronico di cellule senescenti, spesso esacerbato da cicli ripetuti di chemioterapia, crea un effetto dannoso, un ambiente pro-infiammatorio. In questa fase avanzata, il SASP favorisce l'infiammazione sistemica cronica, promuove la neo-angiogenesi tumorale e facilita la transizione da epiteliale a mesenchimale (EMT), che è un fattore chiave della metastasi (*Coppé et al., 2010; Wang et al., 2024; Langhi Prata, 2023; Vernieri et al., 2022*).

1.6.2 Immunosenescenza: la connessione tra T-cells Exhaustion e p16ink4a

Un evento critico si manifesta quando la senescenza colpisce il compartimento immunitario, un processo chiamato immunosenescenza. I linfociti T senescenti subiscono un drastico calo funzionale, caratterizzato da una capacità ridotta di presentare antigeni e da un'incapacità di rispondere a stimoli mitogenici. A livello molecolare, questo è regolato dall'aumento di specifici "freni" sul ciclo cellulare, noti come p16ink4a e p21cip1, insieme all'espressione di marcatori di esaurimento come PD-1 (*Pawelec, 2019*).

L'accumulo di cellule T positive a p16ink4a è ormai riconosciuto come un biomarcatore definitivo dell'invecchiamento biologico e dell'esaurimento immunitario nei pazienti con cancro al seno. Questo decadimento immunitario compromette i meccanismi naturali di sorveglianza del corpo, permettendo alle cellule cancerose residue di sfuggire al rilevamento. (*Liu et al., 2009*).

1.7 Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs)

Nel complesso mondo del cancro, i cambiamenti nell'equilibrio del corpo sono un segnale chiave della progressione. Le cellule tumorali rilasciano varie citochine e fattori di crescita che inficiano la normale produzione di cellule del sangue. Questa "mielopoiesi

d'emergenza" altera lo sviluppo delle cellule staminali del sangue nel midollo osseo e in altri organi linfatici come la milza. Come mostrato nella Figura 5, invece di trasformarsi in macrofagi o neutrofili attivi, queste cellule interrompono il loro sviluppo, causando un aumento delle Cellule Soppressorie di derivazione mieloide (MDSC) (*Aliazis et al.*, 2024; *Veglia et al.*, 2021; *Lu et al.*, 2024). Queste cellule mieloidi immature sono molto varie e sono suddivise in due gruppi clinici in base al loro tipo: Polimorfonucleari (PMN-MDSC) (CD11b+ CD15+ CD14-) e Monocitiche (M-MDSC) (CD11b+ CD14+ HLA DR-/low CD15-) (*Gradishar et al.*, 2023).

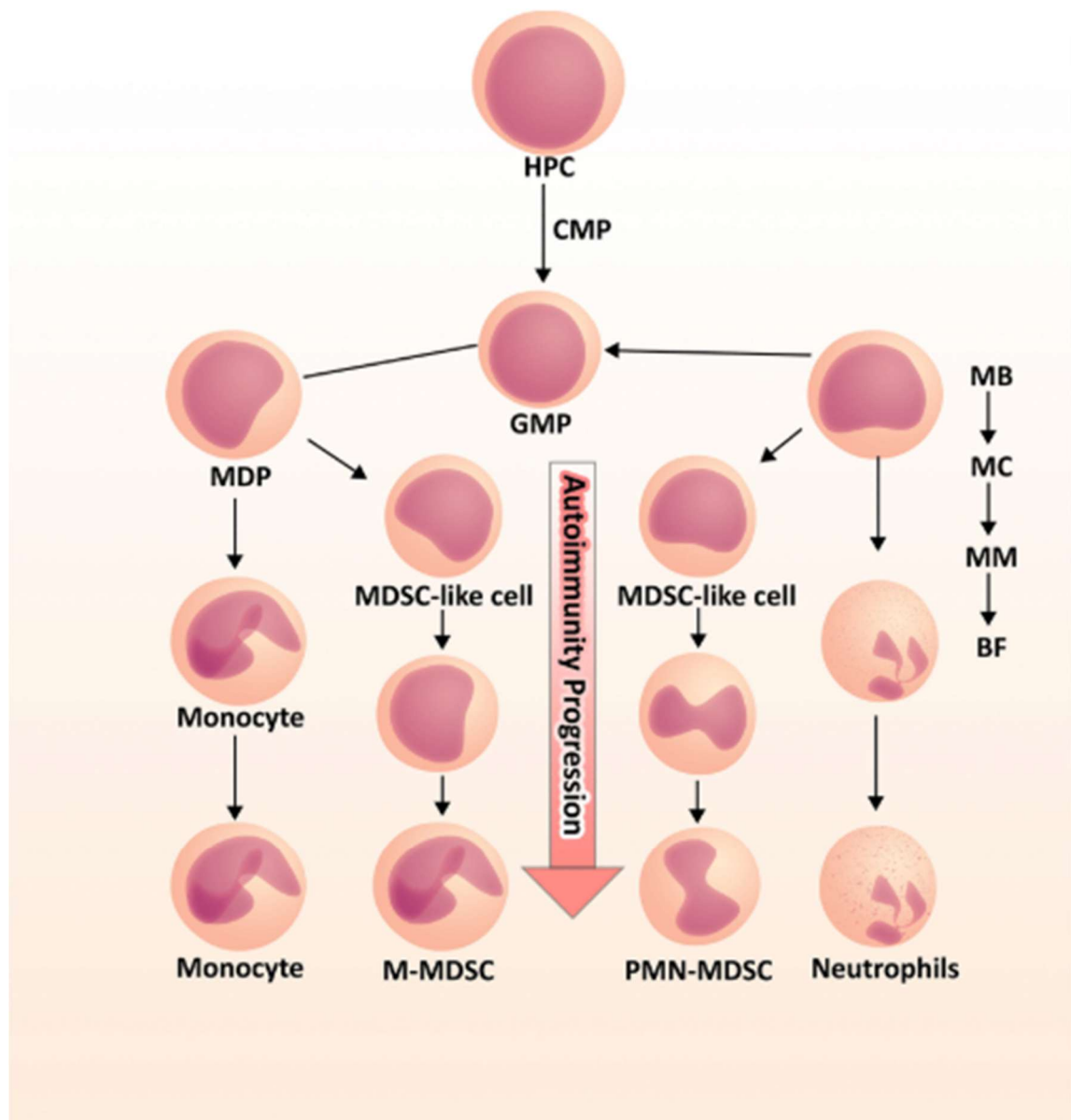


Figura 5: Alterazione della mieloipoiesi. In condizioni fisiologiche, le cellule progenitrici ematopoietiche (HPC) si differenziano prima in progenitori mieloidi comuni (CMP) e poi in cellule progenitrici granulocitiche/macrofagiche (GMP), che sono immature (IMC). Successivamente, possono differenziarsi in cellule progenitrici monocitiche/dendritiche (MDP) o in mieloblasti (MB), dai quali si differenziano rispettivamente cellule dendritiche (DC)/macrofagi e neutrofili. Durante malattie croniche come i tumori, la

mielopoiesi e la differenziazione dei progenitori sono alterate, portando all'accumulo di cellule mieloidiche soppressorie derivate da mielociti e polimorfonucleari (M/PMN-MDSC). (Lu et al. 2024).

1.7.1 Meccanismi d'azione: la strategia della deplezione dei nutrienti

La caratteristica principale delle MDSC è la loro forte capacità di indebolire il sistema immunitario dell'ospite, soprattutto prendendo di mira le risposte anti-tumorali guidate dai linfociti T. Oltre a esprimere molecole di checkpoint come PD-L1, le MDSC svolgono principalmente la loro funzione immunosoppressiva attraverso la "fame metabolica" nell'ambiente tumorale (*Goldman e Medina, 2024; Wang et al., 2025*):

- **Metabolismo dell'arginina:** le MDSC aumentano notevolmente l'attività di enzimi come l'arginasi-1 (ARG-1) e la ossido nitrico sintasi (NOS). Consumando rapidamente la L-arginina, limitano l'accesso dei linfociti T a un amminoacido cruciale per costruire il recettore dei T-cell (TCR) e per la crescita cellulare. Il sottoprodotto, l'ossido nitrico, porta anche alla morte dei linfociti T. Inoltre, ARG-1 L'attività aiuta a produrre collagene, che supporta i cambiamenti strutturali nella zona del tumore per la crescita (*Bai et al., 2025; Vernieri et al., 2022*).
- **Carenza di Cisteina:** Le cellule T non possono produrre cisteina da sole e devono captarla dall'ambiente circostante. Le MDSC si comportano come "spugne metaboliche", assorbendo cisteina senza permettere che la cisteina torni nell'ambiente. Questa "trappola della cisteina" impedisce alle cellule T di creare Glutathione, rendendole più sensibili allo stress e alla perdita di funzione (*Goldman e Medina, 2024*).

1.7.2. Significato Clinico e Valore Prognostico

Le cellule soppressorie di derivazione mieloidica (MDSC) rappresentano un importante meccanismo fisiologico di regolazione della risposta immunitaria, poiché contribuiscono a limitare il danno ai tessuti sani durante condizioni di infiammazione persistente o infezioni croniche. Nel contesto tumorale, tuttavia, la loro espansione e il loro accumulo favoriscono l'immunosoppressione e possono contribuire alla resistenza ai trattamenti. Nei soggetti sani, le PMN-MDSC sono generalmente assenti o presenti in quantità molto ridotte, mentre le M-MDSC si mantengono a bassi livelli. Nei pazienti con carcinoma mammario, al contrario, entrambe le popolazioni possono aumentare sia nel sangue periferico sia nel microambiente tumorale. Diversi studi hanno inoltre evidenziato un'associazione tra l'aumento delle MDSC e una maggiore estensione della malattia, comprese dimensioni tumorali più elevate.

I recenti dati clinici (2025–2026) dimostrano che le MDSC non solo servono come indicatori di prognosi sfavorevole, ma anche come marcatori critici di resistenza alla chemioterapia neoadiuvante (NAC). Il loro accumulo crea uno 'scudo metabolico' all'interno del microambiente tumorale che ostacola significativamente il raggiungimento di una risposta completa patologica (pCR) (Goldman e Medina, 2024).

1.8 Linfociti T senescenti (TSEN) e linfociti T esausti (TEXH)

In situazioni di stimolazione cronica dell'antigene, come nel cancro al seno, i linfociti T spesso affrontano problemi funzionali. È importante capire la differenza tra senescenza dei linfociti T (TSEN) ed esaurimento dei linfociti T (TEXH) perché hanno risultati biologici diversi e implicazioni diverse per le risposte ai trattamenti (Wherry e Kurachi, 2015).

- **T-cells exhaustion (TEXH):** l'esaurimento è uno stato graduale di disfunzione secondaria derivante da un segnale continuo dei TCR (recettori delle cellule T). È caratterizzato da una progressiva perdita di funzioni chiave, come la produzione di IL-2 e IFN- γ , e da un aumento dei checkpoint inibitori, principalmente PD-1, TIM-3 e LAG-3. TEXH rappresenta un "esaurimento" metabolico; le cellule sono ancora vive e spesso possono essere rivitalizzate tramite il blocco dei checkpoint immunitari (ICB) o cambiamenti metabolici derivanti dall'attività fisica e dall'integrazione di DHA, che aiutano a ristabilire la salute mitocondriale (Blank et al., 2019; Vernieri et al., 2022).
- **T-cells senescence (TSEN):** è uno stato permanente di arresto del ciclo cellulare, spesso causato da danni al DNA derivanti dalla chemioterapia o dallo stress metabolico dovuto alle MDSC. A differenza delle cellule esauste, le cellule T senescenti mostrano cambiamenti significativi, inclusa la perdita di molecole costimolatorie (CD28) e livelli aumentati di p16ink4 α e p21cip1. Queste cellule non sono solo "stanche"; biologicamente sono più vecchie e rilasciano fattori SASP dannosi, che indeboliscono ulteriormente l'ambiente immunitario. TSEN è generalmente considerata irreversibile, rendendola un ostacolo importante per raggiungere la pCR nei pazienti che ricevono Terapia Neoadiuvante (NAT) (Akbar et al., 2016; Pawelec, 2017).

1.9 Infiammazione sistemica nel cancro

L'infiammazione è una risposta protettiva che si è evoluta per combattere stimoli dannosi, come patogeni o cellule danneggiate, e per avviare la riparazione dei tessuti. Quando “l'interruttore” del corpo per l'infiammazione acuta non funziona, questa si trasforma in uno stato cronico e di basso grado. Nel cancro, questa infiammazione continua

gioca un ruolo chiave sia nell'inizio che nella progressione del tumore. Rilasciando specie reattive dell'ossigeno (ROS), proteasi e fattori pro-angiogenici come VEGF, l'infiammazione cronica causa instabilità genomica e crea un microambiente che permette alle cellule tumorali di proliferare senza controllo (*Grivennikov et al., 2010; Mantovani et al., 2008*).

2. Scopo dell'elaborato

Il presente lavoro di tesi si inserisce nell'ambito dello studio clinico NEOMET, volto a valutare l'effetto dell'esercizio fisico e della supplementazione con acidi grassi omega-3, singolarmente o in combinazione, sulla risposta alla terapia neoadiuvante nelle pazienti con carcinoma mammario operabile. Il razionale si basa sull'ipotesi che la modulazione del profilo metabolico possa favorire la funzionalità immunitaria e la risposta ai trattamenti antitumorali.

L'obiettivo di questa tesi è identificare potenziali biomarcatori di risposta alla terapia neoadiuvante, nella prospettiva di contribuire alla personalizzazione del trattamento e al miglioramento della sua efficacia. Abbiamo condotto un'analisi preliminare mirata a caratterizzare le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC), i linfociti T con fenotipo senescente o esausto e la loro relazione con le citochine proinfiammatorie circolanti, in quanto coinvolti nei processi di immunosoppressione, che possono compromettere la risposta immunitaria antitumorale.

A tale scopo, sono state condotte le seguenti analisi:

- caratterizzazione mediante citometria a flusso delle cellule soppressorie di derivazione mieloide di tipo monocitario (M-MDSC) e polimorfonucleato (PMN-MDSC) e dei linfociti T con fenotipo senescente (Tsen) ed esausto (Texh), valutandone le frequenze al basale, dopo due cicli di terapia e al termine della terapia neoadiuvante, prima della chirurgia;
- confronto delle frequenze di tali sottopopolazioni tra le pazienti che hanno raggiunto una risposta patologica completa (pCR) e quelle con malattia residua;
- valutazione delle concentrazioni plasmatiche di IL-6 e TNF- α , delle loro variazioni durante la terapia neoadiuvante e delle correlazioni con le frequenze delle sottopopolazioni leucocitarie circolanti;
- analisi esplorativa delle frequenze delle sottopopolazioni leucocitarie e delle concentrazioni plasmatiche delle citochine nei diversi bracci dello studio, per indagarne la possibile modulazione associata all'esercizio fisico e alla supplementazione con acidi grassi omega-3.

3. Materiali e metodi

3.1 Disegno dello studio e arruolamento dei pazienti (NEOMET)

Questa ricerca è condotta nell'ambito dello studio NEOMET, uno studio esplorativo, randomizzato, multicentrico di Fase II di tipo interventistico. Lo studio esplora il potenziale sinergico delle modifiche dello stile di vita insieme alla normale assistenza oncologica. Lo studio è progettato per arruolare un totale di 160 partecipanti; tuttavia, in questa tesi sono stati analizzati 39 pazienti.

3.2 Criteri di eleggibilità

Seguendo le linee guida cliniche aggiornate al 2026 e la Dichiarazione di Helsinki, i partecipanti sono stati selezionati in base ai criteri mostrati nella Tabella 3:

Tabella 3: Criteri di inclusione ed esclusione dello studio.

CRITERI DI INCLUSIONE	CRITERI DI ESCLUSIONE
<ul style="list-style-type: none">• Donne (indipendentemente dallo stato menopausale) di età ≥ 18 anni• Diagnosi di carcinoma mammario confermata istologicamente• Eleggibilità per chemioterapia neoadiuvante• Assenza di eventi avversi clinicamente significativi durante la somministrazione del trattamento• Capacità di comprendere le procedure dello studio e fornire il consenso informato	<ul style="list-style-type: none">• Età < 18 anni• Non eleggibilità per chemioterapia neoadiuvante• Evidenza di malattia metastatica• Incapacità di comprendere e/o firmare la documentazione di consenso informato• Tumore di dimensione < 1 cm con linfonodi assenti• Malattie croniche o problemi ortopedici che potrebbero interferire con la capacità di seguire un programma dietetico o effettuare esercizio fisico

3.3 Randomizzazione e divisione in bracci

Nel momento dell'adesione allo studio, i pazienti sono stati randomizzati in quattro diversi bracci di intervento per valutare gli effetti individuali e combinati delle diverse strategie:

- **Braccio A (Controllo):** I pazienti ricevono la NAT standard insieme a raccomandazioni generali per uno stile di vita sano;
- **Braccio B (Nutrizionale):** I pazienti ricevono la NAT standard integrata con alte dosi di n-3 Lc-PUFA (DHA/EPA) per modulare l'infiammazione sistemica;

- **Braccio C (Esercizio):** I pazienti ricevono la NAT standard insieme a un programma di esercizio fisico supervisionato (combinando allenamento aerobico e di resistenza);
- **Braccio D (Combinato):** I pazienti ricevono l'intervento completo, inclusa la NAT standard, l'esercizio supervisionato e l'integrazione di DHA/EPA, per indagare la sinergia nell'attaccare lo “scudo metabolico” del tumore.

3.4 Procedura di raccolta e trasporto dei campioni biologici

Per ogni paziente incluso nello studio, è prevista la raccolta di 30 mL di sangue periferico in provette con anticoagulante EDTA a tre *timepoints*: prima dell'inizio della terapia (T0, baseline), dopo circa 15 giorni dall'inizio della terapia (T1) e al termine della terapia (*End of Therapy* – EoT). Ciascuna provetta di sangue periferico viene etichettata segnando il codice univoco assegnato al soggetto, la data di nascita e quella del giorno del prelievo e il *timepoint* a cui è stato fatto il prelievo.

A seguito del prelievo presso il reparto di Oncologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Università del Piemonte Orientale, di Novara, i campioni di sangue sono stati trasportati e processati entro 4 ore dalla raccolta al Centro per la Ricerca Traslazionale e le Malattie Autoimmuni e Allergiche (CAAD), Università del Piemonte Orientale, di Novara.

3.5 Isolamento delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs)

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state isolate tramite centrifugazione a gradiente di densità usando Ficoll-Paque (Lympholyte-H, Cedarlane, Paesi Bassi), un polimero sintetico ramificato derivato da saccarosio ed epicloridrina ad elevato peso molecolare ed estremamente idrosolubile. Questa tecnica sfrutta la diversa densità delle cellule mononucleate (linfociti e monociti) rispetto agli altri elementi corpuscolati del sangue. Infatti, le cellule mononucleate e le piastrine, che presentano una minore densità, si concentrano sopra lo strato di F/H; viceversa, i globuli rossi ed i granulociti si raccolgono sul fondo della provetta.

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

Circa 7,5–10 mL di sangue intero sono stati trasferiti in un tube Falcon da 50 mL. La provetta originale di raccolta è stata risciacquata con 3 mL di soluzione di NaCl 0,9% per recuperare il sangue residuo, e poi è stata aggiunta soluzione fisiologica fino a raggiungere un volume finale di 30 mL. Il sangue diluito è stato mescolato delicatamente. Successivamente, 15 mL di soluzione di Ficoll sono stati aggiunti con attenzione sul fondo della falcon usando una pipetta elettrica da 10 mL, facendo attenzione a non mescolarlo con il sangue diluito. I campioni sono stati centrifugati a 2200 rpm per 20 minuti con accelerazione impostata su 7 e senza freno (decelerazione 0).



Figura 6: Flusso di Lavoro per ottenere le PBMC. Adapted from Turocy J, Williams Z. *Fertility and Sterility* 2021.

Dopo la centrifugazione, lo strato di cellule mononucleate (*ring*) situato tra plasma e Ficoll è stato raccolto con cura e trasferito in una nuova falcon da 50 mL. Le cellule sono state lavate con soluzione fisiologica riempiendo la falcon fino a 50 mL e centrifugate a 1600 rpm per 7 minuti (accelerazione e decelerazione 9). Il surnatante è stato scartato e il passaggio di lavaggio è stato ripetuto. In caso di una contaminazione residua di eritrociti, facilmente visibile con una colorazione rossa, è stata effettuata la lisi dei globuli rossi usando il buffer di lisi (rapporto di volume 1:1) per un massimo di 5 minuti, seguita da un ulteriore lavaggio.

Infine, il pellet cellulare è stato risospeso in un volume appropriato di soluzione fisiologica a seconda delle dimensioni del pellet. Il conteggio delle cellule è stato effettuato usando una camera di Bürker dopo aver diluito 10 μ L di sospensione di PBMC in 90 μ L di soluzione TURK. Questa soluzione è composta da una miscela di alcol etilico, acido acetico, glicerolo e fenolo, permette la colorazione delle cellule leucocitarie, rendendo più semplice la conta delle singole cellule vive. Al microscopio è necessario contare almeno 3 quadranti

preferibilmente in diagonale. Le cellule lungo i due margini selezionati vengono conteggiate, successivamente si procede con la conta di quelle all'interno del quadrante. Infine, si calcola la media delle cellule contate all'interno dei quadranti e si moltiplica il risultato per il fattore di diluizione (10^4). Successivamente le PBMCs vengono suddivise per ulteriori analisi.

3.6 Citofluorimetria

La citometria a flusso, o citofluorimetria, rappresenta una tecnica multiparametrica di laboratorio capace di analizzare, quantificare e separare cellule o microparticelle in una sospensione liquida. Il campione di cellule, precedentemente arricchito con anticorpi coniugati a fluorocromi, viene inserito all'interno di una camera di flusso che permette la visualizzazione delle cellule in analisi in modo selettivo e organizzato. Le cellule, inoltre, subiscono un processo di allineamento che ne consente la corretta visualizzazione. Il segnale generato durante l'analisi viene acquisito e trasformato in un grafico mediante l'impiego di software specifici. Questa tecnica a flusso dispone di uno strumento denominato citofluorimetro caratterizzato dalla presenza di laser (i più complessi hanno più di sette fasci di luce) che favoriscono una analisi rapida e automatica delle popolazioni in sospensione, misurandone contemporaneamente le caratteristiche fisiche e/o biochimiche quali volume, complessità e fluorescenza appartenenti alla stessa popolazione cellulare. Tale strumento permette l'analisi di marcatori di differenziamento cellulare, di superficie, intracitoplasmatici e intranucleari oppure la valutazione del contenuto cellulare di DNA. Attraverso la citometria a flusso è anche possibile fare un'analisi del ciclo cellulare, discriminare tra cellule vive, apoptotiche o necrotiche. Per le analisi vengono adoperati tanti fluorocromi differenti che emettono a diverse lunghezze d'onda (<https://gruppobios.it>).

La potenzialità di questa tecnica è la capacità di avere sia la frequenza di una determinata popolazione, espressa in percentuale o come numero di eventi (singole cellule identificate dal citofluorimetro), sia i livelli di espressione di un determinato marcatore, mediante un valore arbitrario di Intensità Media di Fluorescenza (*Mean Fluorescence Intensity*-MFI). Il MFI è calcolato come la media dell'intensità di fluorescenza per tutte le cellule che passano attraverso il laser nel citofluorimetro. Ogni cellula viene eccitata dalla luce laser e l'emissione di fluorescenza viene rilevata e misurata. La fluorescenza può derivare da anticorpi coniugati a fluorocromi, coloranti vitali o proteine fluorescenti. Il MFI

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

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

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

Il citofluorimetro si avvale di tre componenti fondamentali ovvero:

- **Sistema fluidico**: consente di trasportare il campione con focalizzazione idrodinamica mediante l'uso del *sheath fluid*, che ha il compito di creare una guaina e rivestire le cellule per creare un flusso lineare. All'interno del macchinario ci sono una serie di canalicoli che convogliano le cellule. Lo strumento si avvale anche di due taniche una di *sheath fluid* e una di *waste*. In quest'ultima viene riversato il campione con il fluido precedentemente citato post-acquisizione. È fondamentale evitare l'ingresso di aria all'interno della macchina. In seguito all'accensione si devono effettuare lavaggi con soluzioni apposite (solitamente ipoclorito) al fine di eliminare i residui di campioni delle acquisizioni precedenti.

- **Sistema ottico:** comprende i laser come fonte di luce e un sistema di indirizzamento dei fasci luminosi mediante l'utilizzo di specchi e prismi per convergere il raggio luminoso ai rivelatori fotomoltiplicatori. I sette laser che sono normalmente presenti hanno delle lunghezze d'onda diverse. Il citofluorimetro adoperato per l'analisi delle metodiche sopracitate è il BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer di BD Bioscience (Milano, Italy) che presenta 5 laser con le seguenti lunghezze d'onda (Roederer, 2001):

Tabella 4: Laser presenti nel citofluorimetro FACSymphony A5 Cell Analyze.

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

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

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

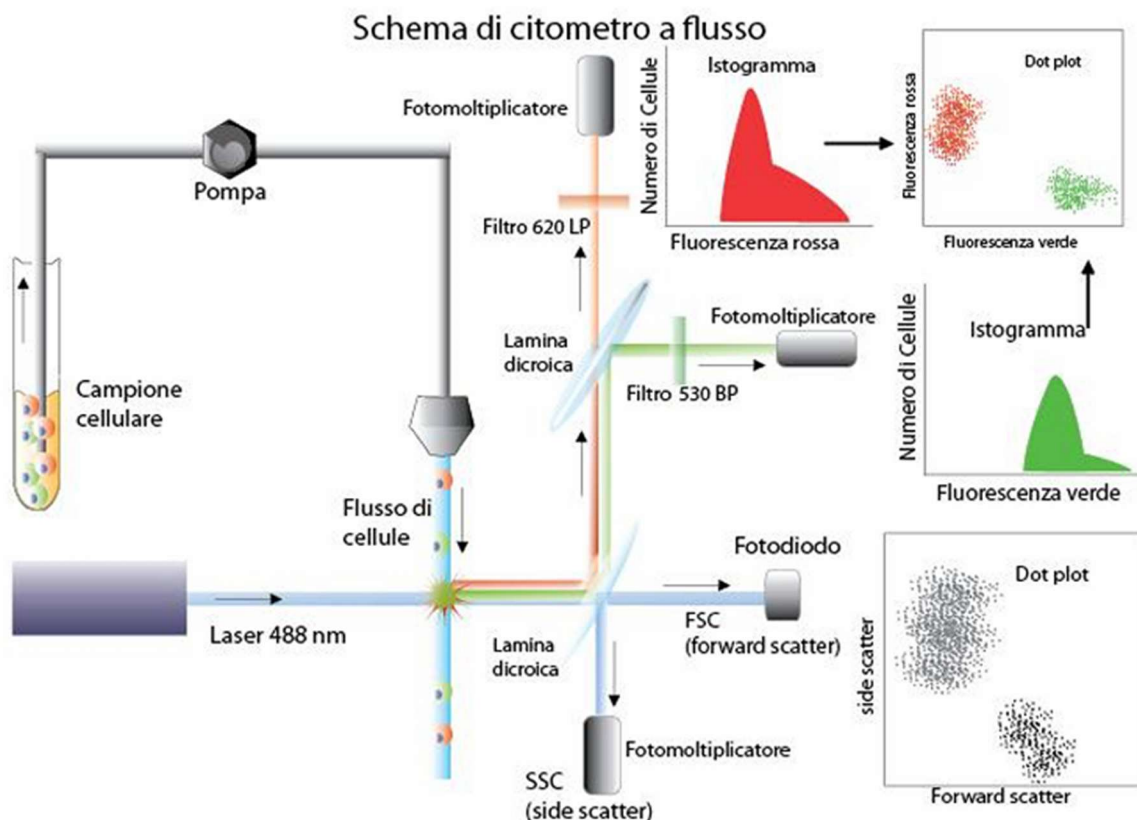


Figura 7: Illustrazione delle componenti e del flusso di lavoro del citofluorimetro. Fonte: <http://biologa.altervista.org/laboratorio-analisi/citometria-a-flusso/>

Mediante l'utilizzo di un ago aspirante le cellule, in una condizione di vuoto e secondo un flusso laminare, vengono trasportate dallo *sheath fluid* nel sistema fluidico dove vengono allineate (focalizzazione idrodinamica) per una rapida acquisizione dei campioni. Si ha poi la componente ottica dei laser, una serie di fotomoltiplicatori, lenti e filtri che sfruttano la dispersione della luce e sono in grado di eccitare i fluorocromi del campione. L'emissione dei segnali di fluorescenza viene captata da sensori, convertita in segnali elettrici e convogliati in un computer che permette la visualizzazione percentuale delle cellule di una popolazione.

Nel sistema ottico vengono valutati due parametri fondamentali:

- **Parametri fisici tramite *light-scattering*:** misura fisica di grandezza/volume FSC e granulosità SSC. Le modalità con cui la luce viene distribuita sulla stessa linea del fascio quindi mediante una dispersione frontale (*forward scatter*, FSC) o laterale (*side scatter* o dispersione laterale, SSC) sono in grado di fornire all'operatore numerose informazioni circa le dimensioni o la complessità della cellula. L'FSC viene riportato sull'asse delle x in un grafico in cui viene messo in relazione con l'SSC che definisce il rapporto

nucleo/citoplasma, granulosità interna e rugosità della membrana (asse delle ordinate). Questo test viene chiamato “*densitometry plot*”.

- **Fluorescenza:** il fluorocromo emette a una λ maggiore rispetto a quella di eccitazione. Tra i fluorocromi più interessanti annoveriamo il FITC che emette a lunghezze d'onda attorno ai 510-520 nm e il PE a 580 nm, mentre per PE-cy7 l'emissione avverrà sui 800 nm. È possibile discriminare i picchi in emissione, tuttavia, le code dei picchi possono sovrapporsi rendendo l'indagine più complessa, motivo per cui si ricorre all'utilizzo di una metodica definita compensazione.

I vantaggi di questa tecnica sono molteplici come:

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

Lo svantaggio è legato al fatto che è una metodica complessa per cui subentrano delle difficoltà nell'analisi che richiedono un operatore competente dello strumento (<https://labtestsonline.it>).

3.6.1 Caratterizzazione linfociti T senescenti (Tsen) ed esausti (Texh) mediante citometria a flusso

La caratterizzazione dei linfociti T senescenti ed esausti (Tsen/Texh) è stata effettuata mediante citometria a flusso multiparametrica su sangue periferico intero. Per ciascun campione sono stati allestiti due tubini specifici per citometria:

1. Controllo: in cui saranno dispensati CD45, CD3, CD4 e CD8 nelle quantità riportate in tabella 5 (tutti gli anticorpi sono forniti dalla ditta BD Bioscience, Milano, Italia). Questo controllo è stato utilizzato per valutare la fluorescenza di fondo nei canali degli altri marcatori e fornire un riferimento per l'analisi dei campioni marcati con i pannelli completi.
2. Tsen/Texh: in cui saranno dispensati tutti gli anticorpi nei volumi indicati in tabella 5 (tutti gli anticorpi sono forniti dalla ditta BD Bioscience, Milano, Italia).

Per ciascun tubino sono stati dispensati 200 µl di sangue intero e sono stati eseguiti 2 lavaggi consecutivi con 1 ml di *staining buffer* (SB – PBS 1X e 2% di FBS) a 400 giri per 10 minuti con freno a temperatura ambiente. Il pellet è stato risospeso in 100 µl di SB e in entrambi i tubini, Controllo e Tsen/Texh, sono stati aggiunti gli anticorpi così come riportato in tabella 5. Entrambi i tubini sono stati incubati a temperatura ambiente per 15 minuti al buio. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 2 ml di tampone di lisi (BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer, BD Biosciences, Milano, Italia) e incubati per 15 minuti al buio. Al termine dell'incubazione, i tubini sono stati centrifugati a 400 giri per 5 minuti e il pellet è stato risospeso in 200 µl di SB per la successiva acquisizione al citofluorimetro (BD FACS Symphony A5 – Beckton Dickinson, Milano, Italia).

Al FACS sono stati acquisiti 30000 eventi nel gate dei CD4 e le analisi sono state fatte utilizzando il software FlowJo v 10 (Beckton Dickinson, Milano, Italia).

Tabella 5: Pannello di anticorpi per caratterizzazione delle cellule T senescenti ed esauste. Per ciascun marcatore sono stati riportati clone, fluorocromo e cosa identifica nel pannello il marcatore. Il volume è espresso in microlitri di anticorpo dispensati per ciascun tubino considerato un volume totale di soluzione (sangue + SB) pari a 200ul.

Antigene	Clone	Fluorocromo	Volume	Ruolo nel pannello
CD45	HI30	BUV395	0.5 µl	Identificazione leucociti mediante gating
CD3	SK7	BV786	1 µl	Linfociti T totali
CD4	SK3	FITC	1 µl	Linfociti T helper
CD8	RPA-T8	BUV496	1 µl	Linfociti T citotossici
KLRG1	13F12F2	PE	1 µl	Marcatore di senescenza
CD57	NK-1	BV421	0.5 µl	Differenziamento terminale
CD28	CD28.2	APC-R700	2 µl	Costimolazione
PD-1	MIH4	BV650	1 µl	Marcatore di esaurimento funzionale
TIGIT	741182	BB700	1 µl	Recettore inibitorio
LAG-3	T47-530	BV480	1 µl	Checkpoint immunitario

3.6.2 Immunofenotipizzazione delle cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC)

La caratterizzazione delle cellule soppressorie di derivazione mieloide (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) è stata eseguita mediante citometria a flusso multicolore a partire da cellule mononucleate del sangue periferico (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC). Per ciascun campione, sono stati allestiti due tubi da citometria:

1. Controllo: in cui sono stati dispensati 0.5×10^6 PBMC e CD45 nel volume indicato in tabella 6. Questo controllo è stato utilizzato per valutare la fluorescenza di fondo nei canali degli altri marcatori e fornire un riferimento per l'analisi dei campioni marcati con i pannelli completi.
2. MDSC *staining*: in cui sono stati dispensati 1×10^6 PBMC e la mix di anticorpi nei volumi riportati in tabella 6.

Per ciascun tubino è stato eseguito un lavaggio con 1 ml di *staining buffer* (SB – PBS 1X e 2% di FBS) a 400 giri per 10 minuti con freno a temperatura ambiente. Il pellet è stato risospeso in 100 μ l di SB e aggiunti gli anticorpi come descritto sopra. Entrambi i tubini sono stati incubati a temperatura ambiente per 15 minuti al buio. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 2 ml di tampone di lisi (BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer, BD Biosciences, California, USA) e incubati per 15 minuti al buio. Al termine dell'incubazione, i tubini sono stati centrifugati a 400 giri per 5 minuti e il pellet è stato risospeso in 200 μ l di SB per la successiva acquisizione al citofluorimetro (BD FACS Symphony A5 – Beckton Dickinson, Milano, Italia).

Tabella 6: Pannello di anticorpi MDSC. Per ciascun marcatore sono stati riportati clone, fluorocromo e cosa identifica nel pannello il marcatore. Il volume è espresso in microlitri di anticorpo dispensati per ciascun tubino considerato un volume totale di soluzione (pellet + SB) pari a 200ul.

Antigene	Clone	Fluorocromo	Volume	Ruolo nel pannello
CD45	HI30	BUV 395	0.5 µ	Identificazione leucociti mediante gating
CD14	M5E2	BUV 737	0.5 µ	Identificazione monociti
CD15	W6D3	BV 510	1 µ	Identificazione granulociti
HLA-DR	G46-6	BV 605	1 µ	Identificazione MDSC mediante gating (HLA-DR basso/-)
CD33	WM53	APC	5 µ	Marcatore linea mieloide
LOX-1	15C4	PE	1 µ	Marcatore specifico PMN-MDSC
CD16	3G8	PE-CY7	0.3 µ	Espressione del recettore Fcγ RIII
PD-L1	MIH1	BV 421	2.5 µ	Ligando del checkpoint immunitario

3.7 MILLIPLEX® Multiplex Immunoassay di IL6 e TNF-α mediante tecnologia Luminex®

Le citochine hanno funzioni diverse e significative nella biologia del cancro al seno, contribuendo in processi che vanno dall'iniziale sviluppo del tumore alla diffusione metastatica (*Dos Santos et al., 2021*).

La quantificazione simultanea delle citochine, IL6 e TNFα è stata effettuata mediante un saggio immunologico multiplex basato sulla tecnologia Luminex® xMAP®, utilizzando il

kit MILLIPLEX® Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A (Merck Millipore, Mialno, Italia). Il kit consente la determinazione simultanea dei due analiti (IL6 e TNF α) nei campioni di plasma conservati a -80°C.

Il principio del metodo si basa sull'impiego di microsferi magnetiche fluorescenti (MagPlex®), caratterizzate da specifiche combinazioni di fluorofori che permettono di identificare univocamente ciascuna popolazione di microsferi (Figura 8). Ad ogni popolazione è associato uno specifico anticorpo di cattura, diretto contro uno degli analiti oggetto di determinazione. La presenza dell'analita nel campione determina la formazione di un complesso immunologico sulla superficie della microsfera, successivamente riconosciuto da un anticorpo di rilevazione biotinilato. L'aggiunta di streptavidina-ficoeritrina consente la rilevazione del complesso mediante il segnale fluorescente emesso dalla ficoeritrina.

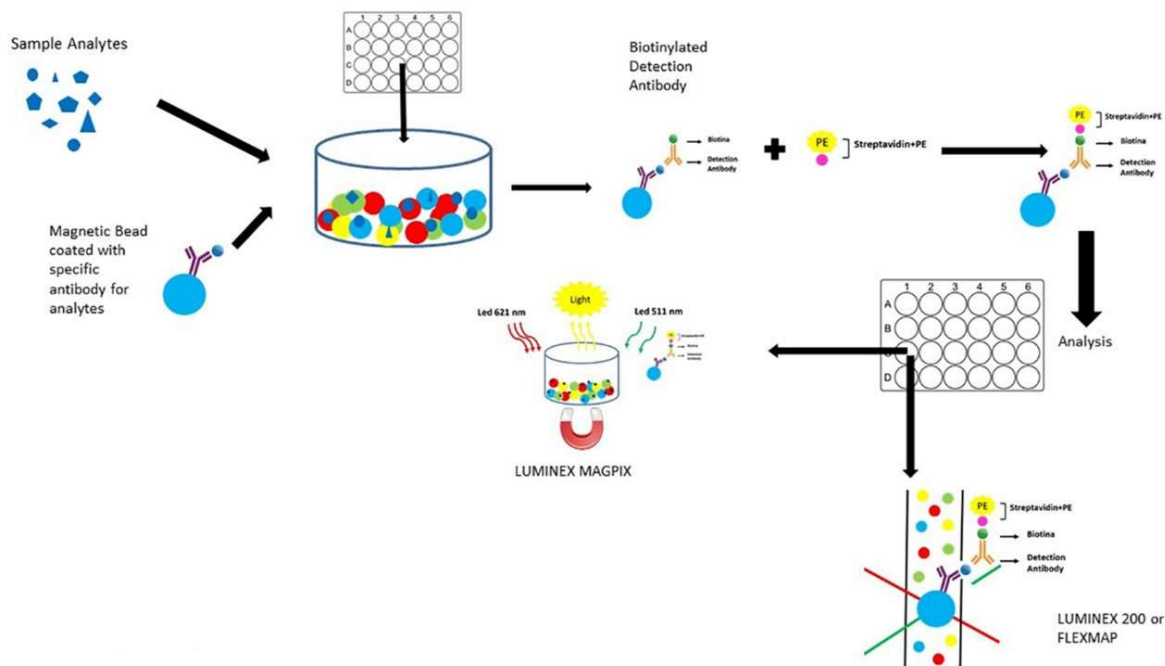


Figura 8: Principio del dosaggio multiplex su microsferi. Fonte: Creative Proteomics / Luminex Multiplex Technology in Cytokine Analysis.

La tecnologia Luminex® permette di identificare contemporaneamente la tipologia di microsfera e l'intensità del segnale fluorescente associato, consentendo quindi di determinare, rispettivamente, l'identità e la quantità dell'analita presente nel campione. La concentrazione degli analiti viene ricavata mediante confronto del segnale ottenuto con una curva standard specifica per ciascun analita.

Prima dell'esecuzione del saggio, tutti i reagenti, dapprima conservati a +4°C, sono stati portati a temperatura ambiente (20–25 °C). La procedura è stata eseguita seguendo le indicazioni riportate nel protocollo fornito dal produttore (*Merck, 2025*).

Inizialmente, ciascun pozzetto della piastra è stato trattato con 200 µL di Wash Buffer e incubato per 10 minuti a temperatura ambiente (20–25 °C) in agitazione. Al termine dell'incubazione, il contenuto dei pozzetti è stato rimosso mediante inversione della piastra e successivo scuotimento su materiale assorbente.

Successivamente, sono stati distribuiti nei rispettivi pozzetti 25 µL di ciascuno standard e dei controlli previsti dal kit. Per la determinazione del segnale di fondo è stato utilizzato lo Standard 0 (background). Nei pozzetti destinati ai campioni sono stati aggiunti 25 µL di Assay Buffer, seguiti da 25 µL della matrice appropriata (*Merck, 2025*).

I campioni di siero o plasma sono stati diluiti secondo le indicazioni del protocollo, utilizzando una diluizione iniziale pari a 1:100. Per i campioni costituiti da surnatanti di colture cellulari è stata utilizzata la matrice prevista dal protocollo del kit. Sono stati quindi aggiunti 25 µL di ciascun campione nei rispettivi pozzetti. Dopo l'aggiunta dei campioni, sono state introdotte 25 µL di microsfere magnetiche precedentemente miscelate. La piastra è stata sigillata e sottoposta a incubazione in agitazione. L'incubazione è stata effettuata *overnight* per 16–18 ore a 2–8 °C. In alternativa, secondo le condizioni previste dal protocollo, il saggio può essere condotto mediante incubazione per circa 2 ore a temperatura ambiente (20–25 °C) (*Merck, 2025*).

Al termine dell'incubazione, il contenuto dei pozzetti è stato rimosso e la piastra è stata sottoposta a tre cicli di lavaggio con 200 µL di Wash Buffer. Successivamente, sono stati aggiunti 25 µL di *Detection Antibody* in ciascun pozzetto. La piastra è stata nuovamente sigillata e incubata per 1 ora a temperatura ambiente, mantenendo l'agitazione.

Al termine dell'incubazione con gli anticorpi di rilevazione, sono stati aggiunti 25 µL di streptavidina-ficoeritrina in ciascun pozzetto. La piastra è stata quindi incubata per ulteriori 30 minuti a temperatura ambiente (20–25 °C) sotto agitazione.

Successivamente, il contenuto dei pozzetti è stato rimosso e la piastra è stata nuovamente sottoposta a tre cicli di lavaggio con 200 µL di Wash Buffer. Le microsfere sono state infine risospese mediante l'aggiunta di 150 µL di Sheath Fluid PLUS. La piastra è stata mantenuta sotto agitazione per circa 5 minuti prima dell'acquisizione (*Merck, 2025*).

3.7.1 Acquisizione dei dati

L'acquisizione dei dati è stata effettuata mediante strumentazione compatibile con la tecnologia Luminex® xMAP®. Nel corso dell'analisi, ciascuna popolazione di microsfere è stata identificata sulla base del proprio codice fluorescente, mentre la concentrazione dell'analita è stata determinata attraverso la misurazione dell'intensità di fluorescenza associata alla ficoeritrina (Merck, 2025).

Per ciascun set di microsfere sono stati acquisiti almeno 50 eventi, al fine di garantire una corretta rappresentatività della popolazione analizzata. I dati sono stati acquisiti mediante il software dedicato alla gestione della strumentazione Luminex®.

I dati ottenuti dall'acquisizione sono stati elaborati mediante il software di analisi associato alla piattaforma Luminex®. Per ciascun analita è stata costruita una curva standard a partire dalle concentrazioni note degli standard forniti con il kit. In tabella 7 sono riportati i range di controlli dei due kit impiegati per la tesi. Le concentrazioni degli analiti presenti nei campioni sono state quindi determinate mediante interpolazione dei valori di fluorescenza sulla relativa curva standard (Merck, 2025).

Tabella 7: Range di controllo di IL-6 e TNF α .

Analita	Controllo	Range
IL-6	Controllo 1	53-110 pg/mL
IL-6	Controllo 2	214-444 pg/mL
TNF- α	Controllo 1	127-264 pg/mL
TNF- α	Controllo 2	478-993 pg/mL

Nel caso di campioni sottoposti a diluizione, la concentrazione ottenuta dall'interpolazione è stata corretta applicando il corrispondente fattore di diluizione, al fine di ricavare la concentrazione effettiva dell'analita nel campione originale.

Le determinazioni sono state eseguite in condizioni controllate e, ove previsto dal disegno sperimentale, in duplicato. L'utilizzo degli standard e dei controlli di qualità forniti dal kit

ha consentito di verificare la corretta esecuzione del saggio e l'affidabilità dei risultati ottenuti (*Merck, 2025*).

3.7.2 Controllo della qualità analitica

Per il controllo delle prestazioni analitiche sono stati utilizzati gli standard e i controlli di qualità forniti dal produttore. La validità delle determinazioni è stata valutata considerando i parametri previsti dal protocollo del kit, tra cui la linearità delle diluizioni, la precisione, la sensibilità analitica e la riproducibilità del metodo.

La strumentazione Luminex® è stata sottoposta alle procedure di calibrazione e verifica delle prestazioni previste dal produttore prima dell'acquisizione dei campioni. Per il sistema Luminex® 200™ e HTS sono stati utilizzati, in particolare, il kit di calibrazione compatibile con xPONENT® e il relativo *Performance Verification Kit*. L'approccio multiplex ha permesso di determinare simultaneamente un ampio numero di mediatori solubili a partire da un singolo campione biologico, consentendo una caratterizzazione complessiva del profilo citochinico e una valutazione integrata delle modificazioni della risposta immunitaria (*Merck, 2025*).

3.8 Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software GraphPad Prism (versione 10). Il confronto dei livelli dei biomarcatori tra i quattro bracci di trattamento è stato effettuato mediante analisi della varianza a una via (one-way ANOVA). Le associazioni tra i biomarcatori selezionati sono state valutate mediante il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman (ρ), che esprime la forza e la direzione dell'associazione, e rappresentate mediante diagrammi di dispersione. Per ciascuna correlazione sono stati riportati il coefficiente ρ e il corrispondente valore di p . È stata adottata una soglia di significatività statistica pari a $p < 0,05$.

4. Risultati

4.1 Descrizione della popolazione in studio

Le caratteristiche generali e cliniche delle 39 pazienti incluse nello studio sono riassunte nella tabella sottostante (Tabella 8).

Tabella 8: caratteristiche generali e cliniche delle pazienti arruolate nello studio.

Codice paziente	DN	BMI	Profilo biologico	TNM	Grado istologico	pCR	Braccio
55-01	22/04/1968	23,05	HER2+	cT2 cN1	G2	NO	D
55-02	22/10/1965	33,2	LUMINALE	cT1c cN1	G3	NO	B
55-03	26/05/1975	21,05	TNBC	cT2 cN0	G3	NO	C
55-04	20/05/1964	24,77	LUMINALE	cTx cN2	nd	NO	C
55-05	18/10/1973	27,31	LUMINALE	cT1 cN1	G2	SI	A
55-06	10/05/1991	19,11	TNBC	cT1c N0	G3	SI	B
55-08	12/06/1994	21,08	LUMINALE	cT4b cN1	G3	NO	A
55-09	09/11/1994	20,96	TNBC	pT2 cN2	G3	NO	C
55-10	11/08/1960	24,22	LUMINALE	cT2 cN0	G2	SI	A
55-11	02/02/1973	24,22	LUMINALE	cT1c cN1	G2	NO	D
55-12	23/04/1959	25,78	LUMINALE	cT2 cN1	G2	NO	D
55-13	13/01/1955	34,96	HER2+	cT2 cN0	G2	NO	A
55-14	17/07/1969	27,25	TNBC	cT1c/2 cN1	G2	SI	C
55-15	30/06/1980	21,48	LUMINALE	cT2 cN1	G2	NO	B
55-16	07/05/1966	25,08	LUMINALE	cT2 N1	G2	NO	A
55-17	16/04/1964	24,91	HER2+	cT1b cN1	G2	SI	A
55-18	04/06/1974	25,99	HER2+	cT2 cN2	G3	SI	D
55-19	10/01/1983	23,55	LUMINALE	cT2 cN1	G3	SI	B
55-20	10/08/1979	27,34	TNBC	cT1cN1	G3	SI	D
55-21	06/12/1965	27,83	LUMINALE	cT2 cN1	G2	NO	B
55-22	30/09/1978	26,64	HER2+	cT3 cN0	G2	SI	B
55-23	10/01/1972	21,48	LUMINALE	cT2 cN1a	G2	NO	C
55-24	15/06/1973	27,55	HER2+	cT2 cN0	G2	NO	D
55-25	29/04/1970	32,02	HER2+	cT2 cN1	G2	SI	D
55-26	30/11/1956	22,76	TNBC	cT2 cN0	G3	SI	B
55-27	28/07/1984	21,48	HER2+	cT1c cN1	G2	NO	D
55-28	17/10/1958	24,22	HER2+	cT2 cN0	G3	SI	B
55-29	01/06/1990	18,83	LUMINALE	cT3 cN1	G2	NO	D
55-32	03/05/1978	42,24	TNBC	cT3 cN3	G3	x	C
55-33	11/09/1974	25,59	TNBC	cTc cN0	G3	NO	A
55-34	25/10/1953	28,76	TNBC	cT2 cN0	G2	SI	D
55-35	13/11/1952	29,38	LUMINALE	cT2 cN0	G2	NO	C
55-36	16/10/1961	23,15	HER2+	cT2 cN1	G3	SI	B
55-37	16/11/1953	25,78	TNBC	cT1c cN1	G3	SI	A
55-38	03/06/1999	19,49	LUMINALE	cT2 cN0	nd	SI	D
55-39	16/04/1984	25,78	TNBC	cT2 cN0	G3	NO	C
55-40	30/10/1971	27,51	LUMINALE	cT3 cN2	G2	SI	A
55-41	30/10/1963	32,35	TNBC	cT1c cN0	G3	SI	B
55-42	03/04/1989	23,05	TNBC	cT2 cN2	G3	NO	C

L'età mediana della popolazione in studio è di 54 anni, con un intervallo di valori compreso tra 27 e 73 anni, di cui 31 pazienti (79,5%) con età < 65 anni e 8 pazienti (20,5%) con età > 65 anni.

La mediana del BMI nella popolazione studiata è 25,08 Kg/m², di cui: 19 pazienti (48,7%) sono normopeso (BMI 18,5-24,9 Kg/m²), 15 pazienti (38,5%) sono sovrappeso (BMI 25–29,9 Kg/m²) e le restanti 5 pazienti (12,8%) sono obese (BMI ≥ 30 Kg/m²).

Importante per la diagnosi e classificazione in sottotipi del carcinoma alla mammella, è il profilo biologico: il più frequente è il luminale, il quale caratterizza 16 pazienti (41%); seguito da TNBC (*Triple Negative Breast Cancer*) presente in 13 pazienti (33,3%) infine HER 2+, caratterizzante le restanti 10 pazienti (25,6%).

In merito alla classificazione TNM (*Tumor Node Metastasis*), la tabella riporta la combinazione per ogni paziente: la combinazione più frequentemente riscontrata è cT2cN0, caratterizzante 10 pazienti su 39 (25,6%), indicativa di un tumore della mammella di dimensioni comprese tra oltre 2 cm e 5 cm, senza evidenza clinica di coinvolgimento dei linfonodi regionali. Come si può evincere dalla tabella 8, nessuna delle pazienti arruolate denota la presenza di metastasi, criterio di esclusione dallo studio.

Ad ogni paziente è stato attribuito un grado tumorale, che funge da guida su come verosimilmente si comporterà il tumore, dal meno grave G1 al più grave G4. È possibile osservare che alla maggior parte delle pazienti è stato attribuito un grado G2 o G3, in particolare: G2 a 21 pazienti (53,8%), G3 a 16 pazienti (41%), mentre per due pazienti questo dato non è disponibile.

Poco meno della metà delle pazienti, precisamente 18 pazienti hanno ottenuto una risposta patologica completa, corrispondente al 47,4 % del totale delle pazienti per cui il dato è noto, considerando che per una paziente il dato non è disponibile, causa prognosi infausta.

Lo studio Neomet prevede una divisione randomizzata in quattro bracci, la tabella riporta che a seguito della divisione casuale: 9 pazienti (23,1%) appartengono al braccio A, 10 pazienti al braccio B (25,6%), 9 pazienti al braccio C (23,1%) e 11 pazienti al braccio D (28,2%).

4.2 Strategia di gating per la caratterizzazione di linfociti T senescenti ed esausti

L'analisi dei linfociti T senescenti ed esausti è stata eseguita in citofluorimetria utilizzando un pannello di marcatori specifici associati a fluorocromi. I linfociti T senescenti sono caratterizzati dalla presenza o assenza di marcatori sulla loro superficie, in particolare in questa tesi abbiamo definito Tsen le cellule che nel *gate* dei CD45⁺ risultano positive per CD57 e KLRG1 e negative per CD28. Per quanti riguarda i T esausti abbiamo definito Texh le cellule che nel *gate* dei CD45⁺ risultano positive a CD28, PD-1, LAG-3 e TIGIT.

La selezione delle cellule di interesse è stata effettuata mediante una strategia di *gating* sequenziale. Inizialmente, è stato definito un gate morfologico utilizzando Forward Scatter (FSC) *versus* Side Scatter (SSC) (Figura 9 A). Il parametro FSC è correlato alle dimensioni cellulari, mentre il parametro SSC riflette la complessità interna e la granularità delle cellule. La combinazione di questi parametri ha consentito di selezionare la regione compatibile con la popolazione linfocitaria vitale, caratterizzata da valori relativamente bassi di FSC e SSC, escludendo i detriti e gli eventi con caratteristiche morfologiche differenti. Successivamente, è stato applicato un “*gate* dei singoletti” considerando FSC-A *versus* FSC-H, che mette in relazione l'area (Area) e l'altezza massima (H, Height) dell'impulso di diffusione frontale (Figura 9B). Le cellule singole presentano una relazione proporzionale tra questi parametri e si distribuiscono lungo una banda diagonale. I doppietti e gli aggregati cellulari possono discostarsi da tale distribuzione e sono stati pertanto esclusi, selezionando gli eventi compatibili con il passaggio di singole cellule attraverso il fascio laser. A seguito della selezione morfologica e dell'esclusione degli aggregati cellulari, la popolazione linfocitaria è stata ulteriormente definita mediante SSC-A *versus* CD45, selezionando gli eventi caratterizzati da bassa granularità ed elevata espressione del marcatore pan-leucocitario CD45 (SSC-A^{low}CD45^{high}) (Figura 9 C). All'interno di questa popolazione, i linfociti T sono stati identificati sulla base della positività per CD3 (Figura 9 D) e successivamente, utilizzando i marcatori CD4 e CD8, sono state individuate, le sottopopolazioni T helper (CD3⁺CD4⁺) e T citotossiche (CD3⁺CD8⁺) (Figura 9 E). In entrambe le sottopopolazioni è stata valutata l'espressione del recettore costimolatorio CD28, distinguendo le cellule CD28⁺ da quelle CD28⁻ (Figura 10-11 A). L'espressione dei recettori inibitori PD-1, TIGIT e LAG-3, ha permesso di identificare il fenotipo dei T esausti (Figura 10 B, C, D, E).

La caratterizzazione del fenotipo associato alla senescenza è stata effettuata mediante l'analisi combinata di KLRG1 e CD57, identificando le cellule doppiamente positive (KLRG1⁺CD57⁺) (Figura 11 B).

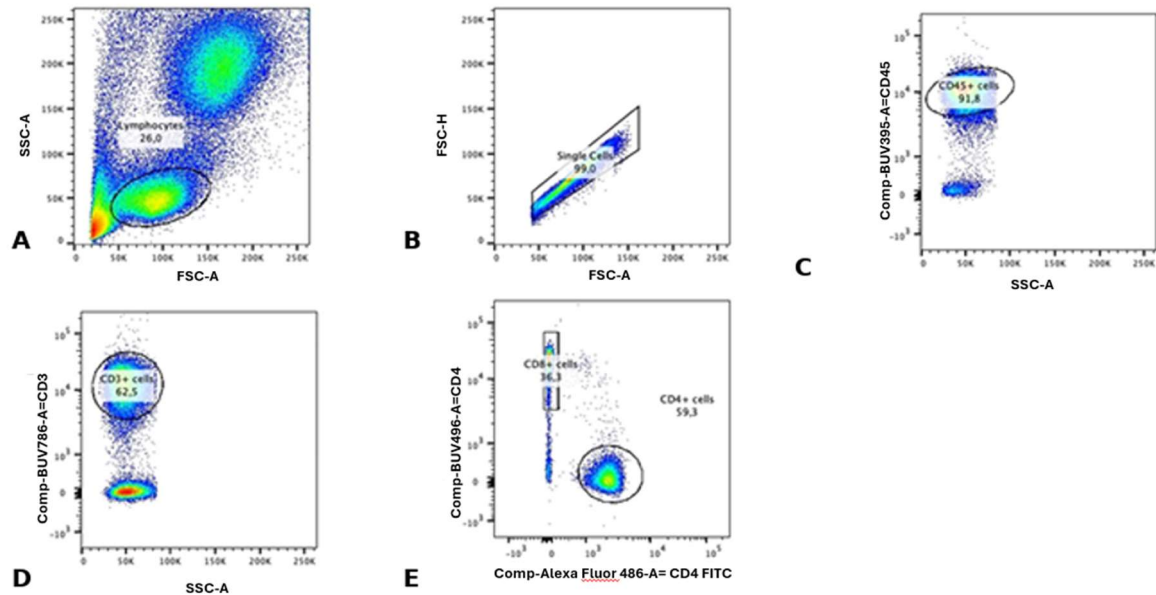


Figura 9: Gating strategy per l'individuazione di cellule CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺. I linfociti sono stati identificati in base alla dimensione e complessità usando FSC-A versus SSC-A (A); in seguito dalla selezione dei singoletti utilizzando FSC-A rispetto a FSC-H (B). Successivamente, il CD45 rispetto a SSC-A è stato utilizzato per identificare la popolazione linfocitaria (C), seguito dalla selezione delle cellule T CD3⁺ (D) e dalla discriminazione delle sottopopolazioni di cellule T CD4⁺ e CD8⁺ (E). Immagini acquisite con BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer di BD Bioscience.

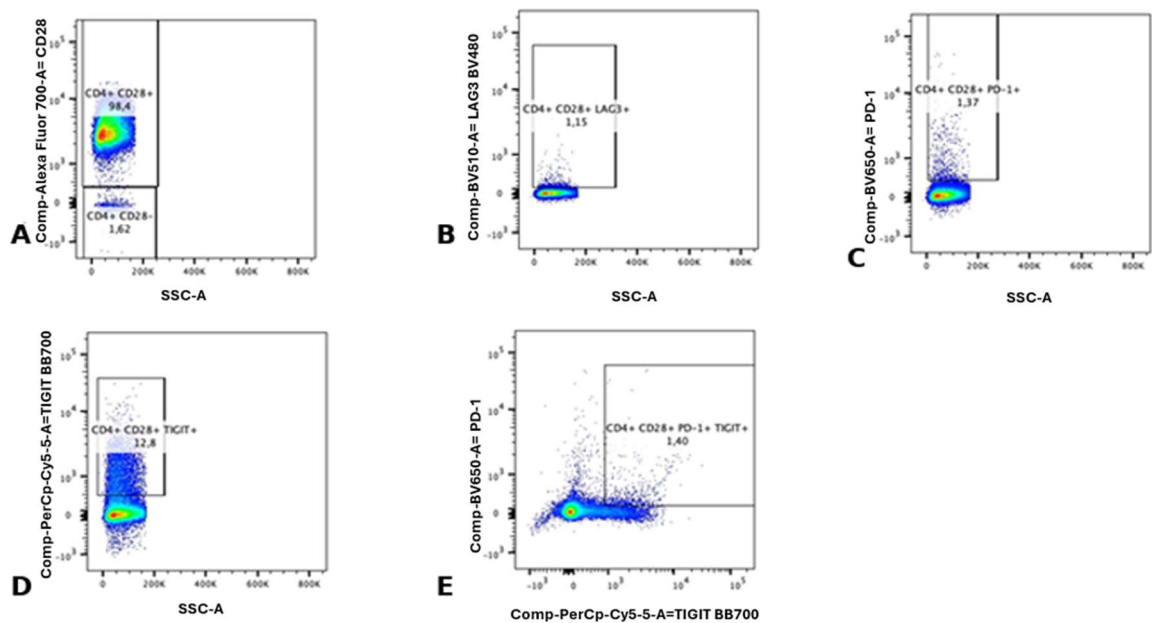


Figura 10: Gating strategy per l'identificazione delle cellule T esauste CD28⁺ mediante l'utilizzo di marcatori TIGIT, LAG3 e PD-1. Selezione della popolazione CD4⁺ CD28⁺ (A); Identificazione delle popolazioni CD4⁺

CD28+ positive rispettivamente per LAG-3, PD-1 e TIGIT (B, C, D). Identificazione della popolazione CD4+ CD28+ caratterizzata dalla co-espressione di PD-1 e TIGIT (E). Immagini acquisite con BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer di BD Bioscience.

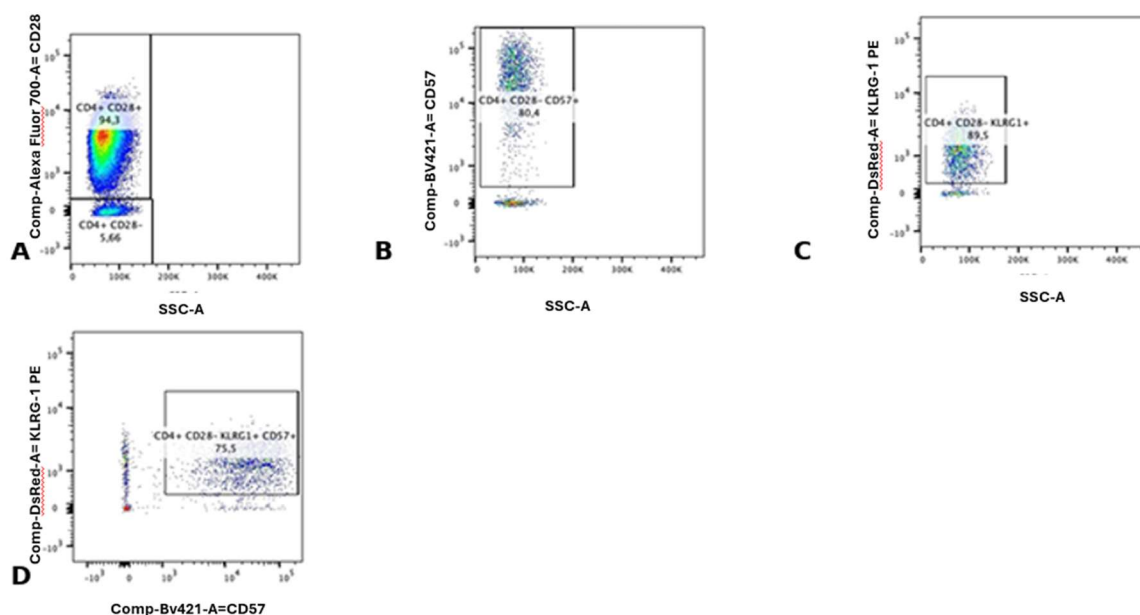


Figura 11: Gating strategy per l'identificazione di cellule T senescenti CD28- mediante l'utilizzo di marcatori CD57 e KLRG1. Identificazione delle popolazioni CD4+ CD28+ e CD4+ CD28- (A). Identificazione della popolazione CD4+ CD28- CD57+ (B). Identificazione della popolazione CD4+ CD28- KLRG-1+ (C). Identificazione della popolazione CD4+ CD28- caratterizzata dalla co-espressione di KLRG-1 e CD57+ (D). Immagini acquisite con BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer di BD Bioscience.

4.3 Strategia di gating delle MDSCs

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

L'identificazione delle popolazioni mieloidi è stata effettuata mediante una strategia di *gating* sequenziale. Inizialmente, è stato definito un *gate* morfologico su un diagramma FSC-A *versus* SSC-A, selezionando gli eventi cellulari in base alle dimensioni e alla complessità interna ed escludendo i detriti (Figura 12 A). Successivamente, mediante il confronto tra SSC-A e SSC-H, sono stati selezionati i singoletti, escludendo gli eventi compatibili con doppietti o aggregati cellulari (Figura 12 B). All'interno della popolazione così selezionata, mediante SSC-A *versus* CD45 sono stati identificati gli eventi leucocitari di interesse sulla base della granularità e dell'espressione del marcatore pan-leucocitario CD45 (Figura 12 C). L'analisi combinata di CD14 e HLA-DR ha quindi permesso di

distinguere la popolazione monocitaria $CD14^+HLA-DR^+$ dalle cellule con fenotipo compatibile con MDSC di origine monocitaria (M-MDSC), identificate come $CD14^+HLA-DR^-$ (Figura 12 D). Mediante $CD15$ versus $CD33$ è stata inoltre individuata la popolazione con fenotipo compatibile con MDSC di origine polimorfonucleata (PMN-MDSC), caratterizzata dalla positività per $CD15$ e da un'espressione intermedia di $CD33$ ($CD15^+CD33^{int}$) (Figura 12 E).

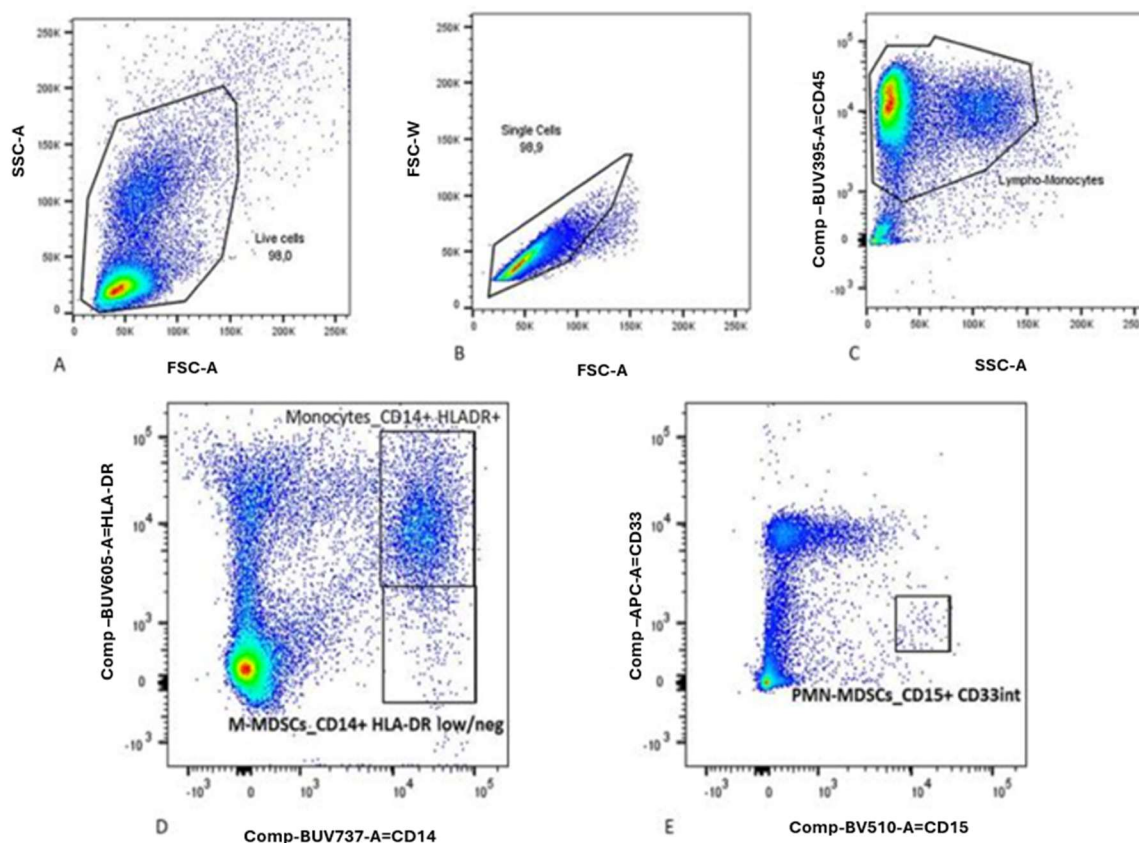


Figura 12: Gating strategy per M-MDSC e PMN-MDSC caratterizzate partendo da PBMCs. L'immagine rappresenta i "dot plots" per questa metodica. Identificazione delle cellule vive (Live cells) mediante analisi FSC-A/SSC-A (A); selezione delle cellule singole (Single Cells) mediante analisi FSC-A/FSC-W (B); identificazione della popolazione linfo-monocitaria sulla base dell'espressione di $CD45$ e dei parametri di scattering (C); identificazione dei monociti $CD14^+ HLA-DR^+$ e della popolazione monocitaria MDSC (M-MDSC) (D); identificazione della popolazione granulocitica MDSC (PMN-MDSC), caratterizzata dal fenotipo $CD15^+ CD33^{int}$ (E). Immagine acquisita con BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer.

4.4 Disponibilità dei dati per i marker analizzati

Prima di procedere all'analisi dei biomarcatori, è stata valutata la disponibilità delle osservazioni per ciascun parametro e tempo di campionamento, al fine di descrivere la completezza del dataset e contestualizzare i risultati successivi. Tale valutazione consente di evidenziare le differenze nella numerosità dei campioni analizzabili, rilevanti per la precisione delle stime, la potenza statistica e l'interpretazione dei confronti longitudinali.

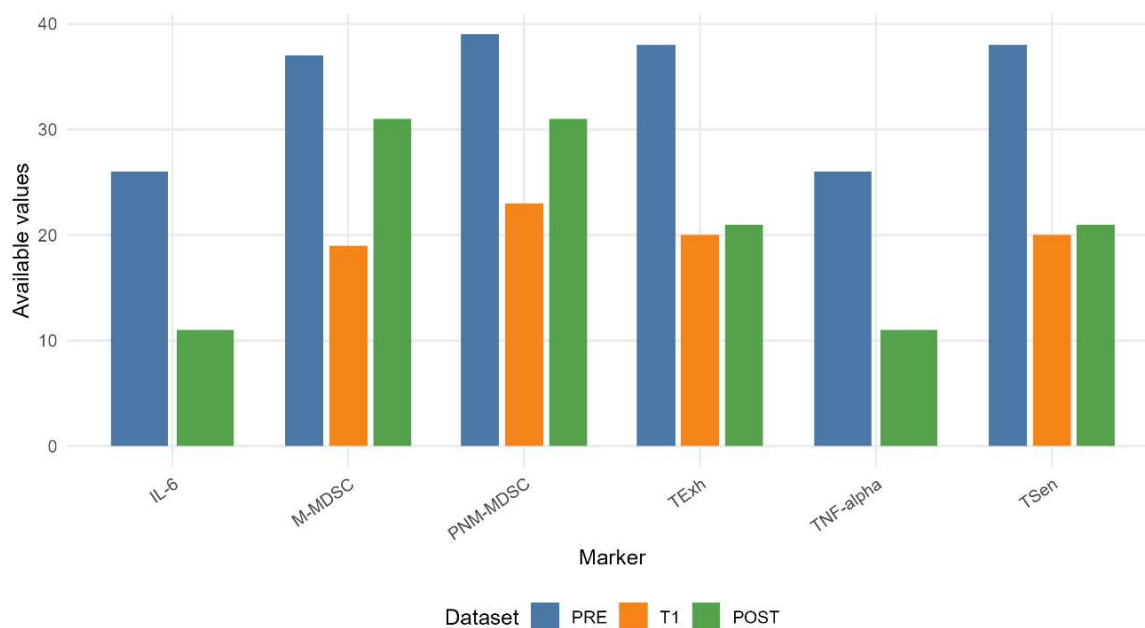


Figura 13: Disponibilità dei dati relativi ai principali marker nei dataset PRE, T1 e POST. Il grafico a barre riporta il numero di misurazione di ogni marker (M-MDSCs, PMN-MDSCs, linfociti T esausti e senescenti) per i tre timepoints. La disponibilità dei dati relativa alle citochine infiammatorie (IL-6 e TNF α) riguarda solo i timepoints PRE e POST. Il grafico segnala una maggiore disponibilità dei marcatori al PRE, piuttosto che negli altri due timepoints.

Il grafico soprariportato (figura 13) mostra il numero di osservazioni disponibili per ciascun marker analizzato prima della successiva interpretazione dei dati e delle analisi statistiche. I marker considerati sono M-MDSC, PNM-MDSC, TExh, Tsen, IL-6 e TNF- α . Ciascuna barra rappresenta il numero di valori disponibili per ciascun marker nei tre timepoints.

La disponibilità delle osservazioni è risultata variabile sia in funzione del marker sia del timepoint analizzato: il timepoint PRE ha mostrato la maggior completezza dei dati, con un numero di osservazioni disponibili compreso tra 26 e 39 per i diversi marker analizzati. Una minore disponibilità dei dati è stata osservata al timepoint T1, ovvero il controllo dopo il

secondo ciclo di terapia: in questo caso non sono risultate disponibili osservazioni per IL-6 e TNF- α , mentre per i marker valutati il numero di osservazioni disponibili è risultato compreso tra 19 e 23. Riguardo il POST, il numero di osservazioni disponibili variava da 11 per IL-6 e TNF- α a 31 per M-MDSC e PNM-MDSC, mentre per TExh e TSen erano disponibili 21 osservazioni.

Le differenze nella disponibilità dei dati sono state tenute in considerazione nelle analisi successive e nell'interpretazione dei risultati.

4.5 Caratterizzazione delle popolazioni cellulari circolanti

Come prima cosa abbiamo analizzato mediante citometria a flusso le MDSC, i linfociti T circolanti e le citochine pro-infiammatorie nei pazienti in studio a diversi timepoints, allo scopo di definire un ruolo predittivo e prognostico di risposta alla terapia neoadiuvante.

4.5.1 Caratterizzazione di M-MDSC e PMN-MDSC in relazione al timepoint e al braccio dello studio

Abbiamo come prima cosa suddiviso i pazienti in base al braccio di intervento e analizzato le variazioni nella frequenza della popolazione M- e PMN-MDSC nel tempo (Pre vs T1 vs EoT), allo scopo di capire se potessero essere considerati biomarcatori di risposta (Figura 14).

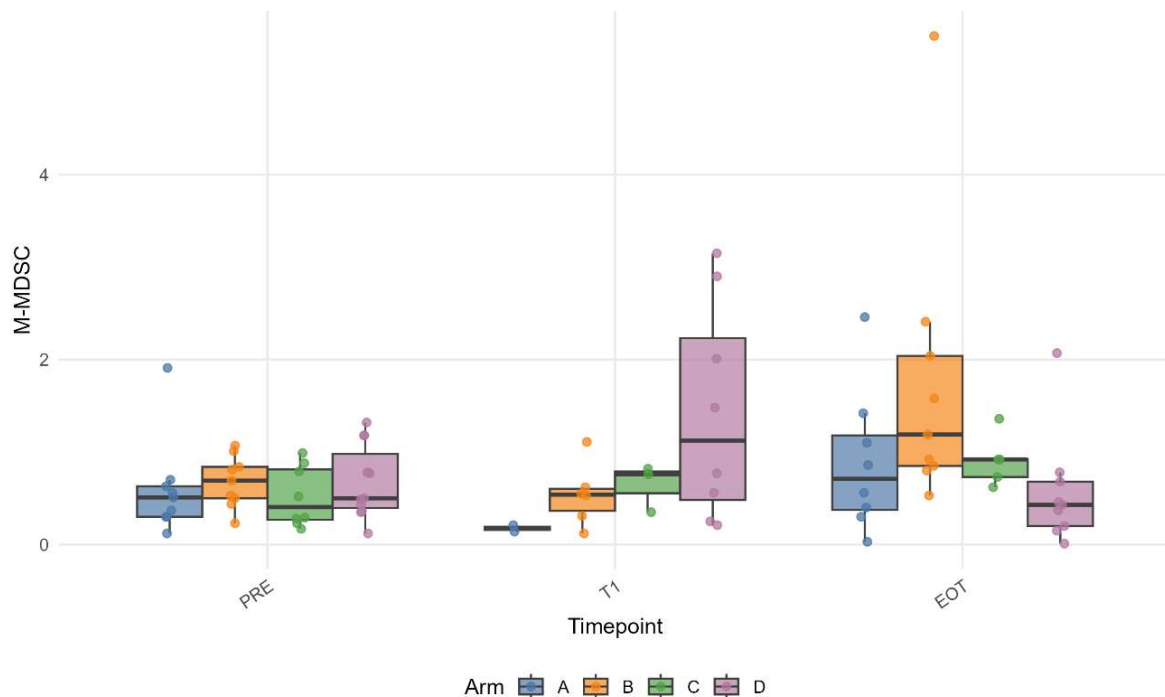


Figura 14: Distribuzione delle M-MDSC al PRE, T1 e POST. Disponibilità campionaria al PRE: braccio A n=8; braccio B n= 9; braccio C n= 8; braccio D n=11. Disponibilità campionaria al T1: braccio A n=2; braccio B n= 6; braccio C n= 4; braccio D n=8. Disponibilità campionaria all'EOT: braccio A n=8; braccio B n= 9; braccio C n= 5; braccio D n=9 ($p = 0,064$).

Come mostrato in figura 14, dopo 2 cicli di terapia (T1) e al termine della terapia (EoT), vi è una variabilità, seppur non significativa, nella frequenza delle M-MDSC circolanti tra i

diversi bracci. La stessa modulazione delle frequenze si osserva anche quando si confrontano T1 ed EoT con i valori al basale, anche se tuttavia non sono significativi.

I valori medi $\pm$ deviazione standard al PRE erano 0.60 ± 0.52 per il Braccio A, 0.68 ± 0.28 per il Braccio B, 0.52 ± 0.33 per il Braccio C e 0.68 ± 0.40 per il Braccio D. Al PRE non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa nella frequenza di M-MDSC tra i quattro bracci di trattamento (analisi della varianza a una via, $p = 0,8004$).

Al T1, i valori medi $\pm$ deviazione standard erano 0.18 ± 0.05 nel Braccio A, 0.54 ± 0.33 nel Braccio B, 0.64 ± 0.26 nel Braccio C e 1.42 ± 1.17 nel Braccio D. Il confronto tra PRE e T1 non ha evidenziato alcuna variazione statisticamente significativa nella frequenza di M-MDSC nella coorte complessiva ($p = 0,673$). All'EOT, i valori medi $\pm$ deviazione standard erano 0.89 ± 0.78 per il Braccio A, 1.76 ± 1.53 per il Braccio B, 0.91 ± 0.28 per il Braccio C e 0.57 ± 0.61 per il Braccio D. Il confronto tra PRE ed EOT non ha evidenziato alcuna variazione statisticamente significativa nella coorte complessiva ($p = 0,064$).

Questi risultati suggeriscono che la frequenza delle M-MDSC circolanti possa essere modulata già nei primi cicli di terapia neoadiuvante. Gli andamenti osservati nei diversi bracci suggeriscono inoltre un possibile contributo della supplementazione con acidi grassi omega-3 e dell'attività fisica a tale modulazione. Tuttavia, la limitata numerosità campionaria impone cautela nell'interpretazione di queste osservazioni preliminari e non consente di trarre conclusioni definitive sull'effetto degli interventi.

Allo stesso modo abbiamo analizzato le frequenze delle PMN-MDSC e anche in questo caso, nonostante vi siano delle variazioni nella frequenza, dopo due cicli di terapia e al termine della stessa, non ci sono dati statisticamente significativi apprezzabili (figura 15).

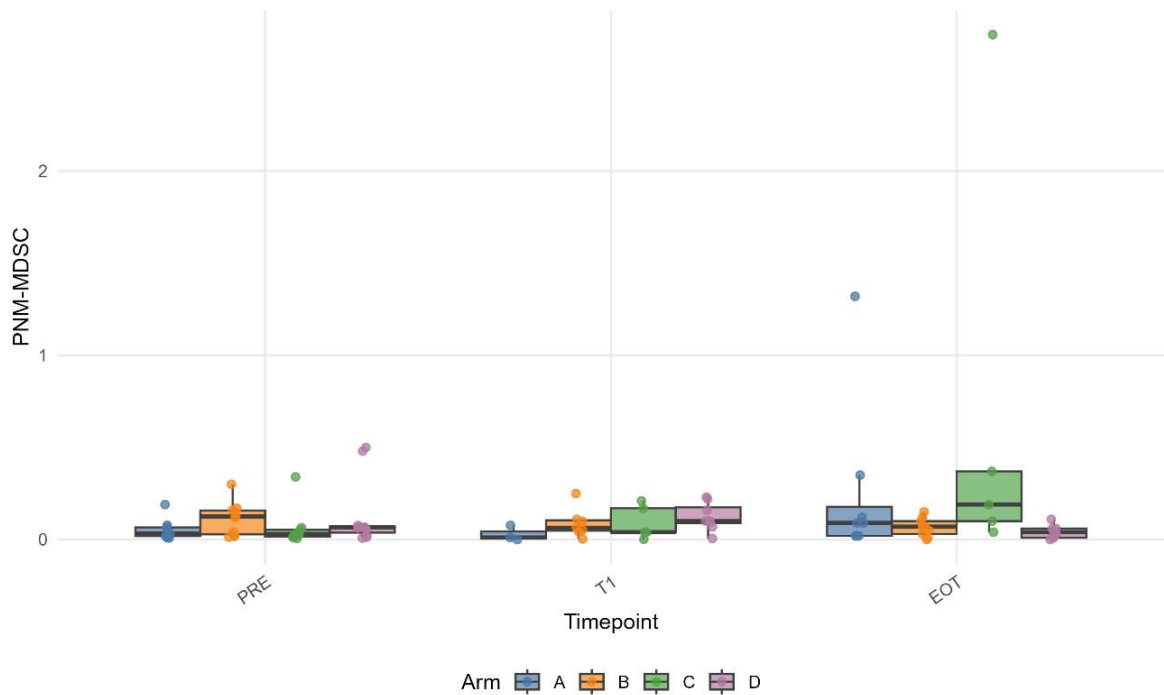


Figura 15: Distribuzione delle PMN-MDSC al PRE, T1 e POST. Disponibilità campionaria al PRE: braccio A n=9; braccio B n= 10; braccio C n= 9; braccio D n=11. Disponibilità campionaria al T1: braccio A n=3; braccio B n= 7; braccio C n= 5; braccio D n=8. Disponibilità campionaria all'EOT: braccio A n=8; braccio B n= 9; braccio C n= 5; braccio D n=9 ($p = 0,1189$).

Al PRE, le frequenze di PMN-MDSC presentavano un valore medio di 0.085 ± 0.114 ($n = 39$), mentre al T1 il valore medio era 0.094 ± 0.078 ($n = 23$). All'EOT, il valore medio è aumentato a 0.208 ± 0.527 ($n = 31$), riflettendo la maggiore variabilità interindividuale osservata in questo timepoint. Complessivamente, il confronto tra PRE e T1 non ha evidenziato alcuna variazione statisticamente significativa nei livelli di PMN-MDSC ($p = 0,699$). Analogamente, il confronto tra PRE ed EOT non è risultato statisticamente significativo ($p = 0,499$). All'EOT non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa tra i quattro bracci di trattamento ($p = 0,1189$).

4.5.2 Caratterizzazione dei linfociti T senescenti (Tsen) e T esausti (Texh) in relazione al timepoint e al braccio di trattamento

Abbiamo analizzato la frequenza dei linfociti T senescenti ed esausti circolanti in base al braccio di intervento, considerando i valori prima, dopo due cicli di terapia e al termine della stessa (Figura 16). Come prima cosa abbiamo suddiviso i nostri pazienti nei 4 bracci e

confrontato i valori delle percentuali di Tsen e Texh tra i bracci nei *timepoints* considerati (figura 16).

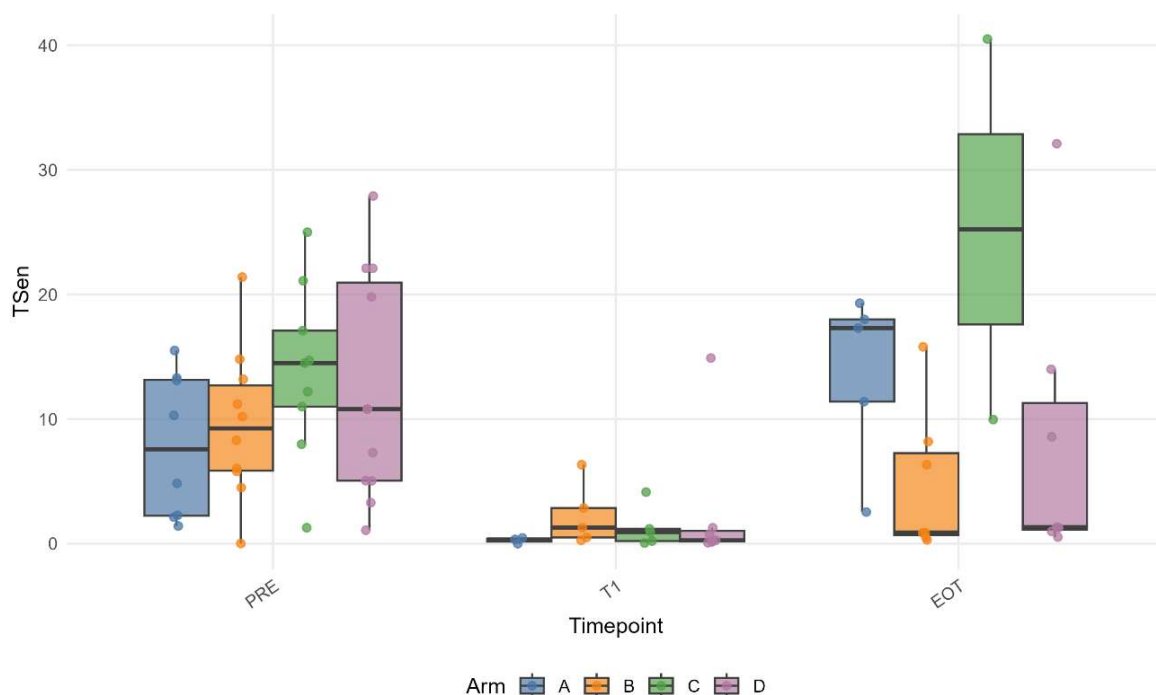


Figura 16: Distribuzione dei linfociti T senescenti al PRE, T1 e POST. Disponibilità campionaria al PRE: braccio A n=8; braccio B n= 10; braccio C n= 9; braccio D n=11. Disponibilità campionaria al T1: braccio A n=3; braccio B n= 5; braccio C n= 5; braccio D n=7. Disponibilità campionaria all'EOT: braccio A n=5; braccio B n= 7; braccio C n= 2; braccio D n=7 ($p=0.0917$).

Abbiamo dimostrato che dopo due cicli di trattamento, i valori di Tsen si riducono significativamente in tutta la coorte (figura 16, $p < 0,001$), indipendentemente dal braccio di trattamento. Questo suggerisce che la fase iniziale del trattamento neoadiuvante possa essere associata ad un incisivo rimodellamento del compartimento circolante delle cellule T senescenti. Non sono invece emerse evidenze di un'ulteriore modulazione associata alla supplementazione con acidi grassi omega-3 e all'esercizio fisico. Osservando i valori al termine della terapia e confrontandoli con quelli al basale (PRE, figura 16), si apprezza un trend nella diminuzione della frequenza dei linfociti T sen nei bracci di trattamento con supplementazione di Omega-3, mentre un aumento in quello con la sola attività fisica (figura 16, C). Tali risultati non sono statisticamente significativi e questo potrebbe essere dovuto dal limitato numero di campioni per braccio e dalla variabilità di valori che si ha nei gruppi. Pertanto, questi dati non consentono di attribuire agli interventi un effetto sulla senescenza

delle cellule T, ma forniscono un'osservazione preliminare da approfondire con l'ampliamento della coorte.

Al PRE, i valori medi $\pm$ deviazione standard erano 7.86 ± 5.81 per il Braccio A, 9.55 ± 6.04 per il Braccio B, 13.87 ± 7.00 per il Braccio C e 12.30 ± 9.13 per il Braccio D. Al PRE non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa nei valori di TSen tra i quattro bracci di trattamento (analisi della varianza a una via, $p = 0,3168$). Al T1, i valori medi $\pm$ deviazione standard erano 0.27 ± 0.24 per il Braccio A, 2.25 ± 2.50 per il Braccio B, 1.31 ± 1.65 per il Braccio C e 2.53 ± 5.47 per il Braccio D. Il confronto tra PRE e T1 ha evidenziato una riduzione statisticamente significativa dei valori di TSen nella coorte complessiva ($p < 0,001$). Riduzioni significative all'interno dei singoli bracci sono state osservate anche nel Braccio A ($p = 0,044$), nel Braccio B ($p = 0,041$), nel Braccio C ($p = 0,021$) e nel Braccio D ($p = 0,019$). All'EOT, tuttavia, TSen è diventato più eterogeneo, con valori medi relativamente più elevati nei Bracci A e C (rispettivamente 13.71 ± 6.94 e 25.23 ± 21.60), mentre il Braccio B è rimasto comparativamente più basso (4.70 ± 5.84). Anche il Braccio D ha mostrato un'ampia distribuzione, con una media $\pm$ deviazione standard di 8.40 ± 11.62 . Il confronto tra PRE ed EOT non ha evidenziato una variazione statisticamente significativa nella coorte complessiva ($p = 0,896$). Analogamente, non sono state osservate variazioni statisticamente significative all'interno dei singoli bracci: Braccio A ($p = 0,387$), Braccio B ($p = 0,249$), Braccio C ($p = 1,000$) e Braccio D ($p = 0,578$).

L'analisi attraverso ANOVA test non ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra i quattro gruppi ($p = 0.0917$).

Anche nel caso dei linfociti T esausti, si osserva una significativa riduzione delle frequenze dopo due cicli di terapia che però si conferma e rimane anche al termine della terapia (figura 17, B e C, T1). Questo andamento suggerisce una modulazione precoce e persistente del compartimento T circolante durante la terapia neoadiuvante. Una possibile spiegazione potrebbe essere che la riduzione del carico tumorale contribuisca ad attenuare la stimolazione antigenica cronica che sostiene il fenotipo di esaurimento. Tale ipotesi, tuttavia, non è direttamente dimostrata dai dati disponibili, in quanto abbiamo pochi campioni a disposizione. La diminuzione osservata potrebbe anche riflettere effetti del trattamento sulla composizione delle popolazioni linfocitarie o sull'espressione dei recettori inibitori utilizzati per identificare i T esausti. Inoltre, non sembrano esserci effetti associati al diverso trattamento.

Saranno pertanto necessarie ulteriori analisi e aumento della numerosità per capire un reale coinvolgimento dei Tsen ed esausti nella modulazione della risposta alla terapia neoadiuvante.

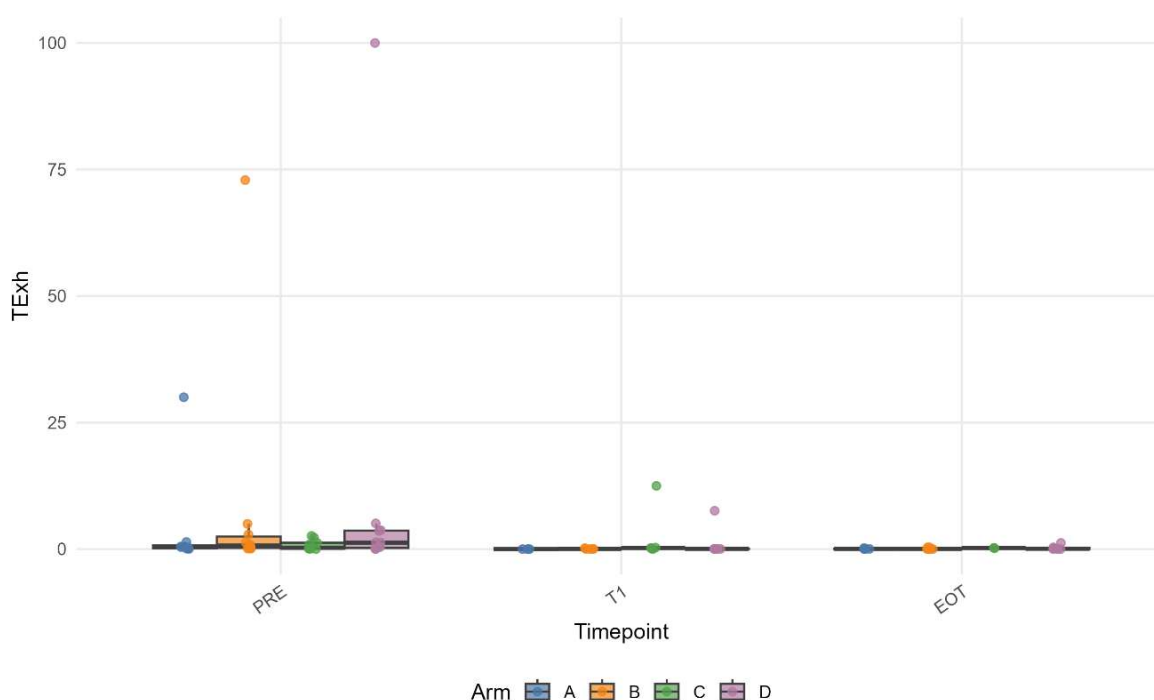


Figura 17: Distribuzione dei linfociti T esausti al PRE, T1 e POST. Disponibilità campionaria al PRE: braccio A n=8; braccio B n= 10; braccio C n= 9; braccio D n=11. Disponibilità campionaria al T1: braccio A n=3; braccio B n= 5; braccio C n= 5; braccio D n=7. Disponibilità campionaria all'EOT: braccio A n=5; braccio B n= 7; braccio C n= 2; braccio D n=7. ($p = 0.6875$).

I valori medi $\pm$ deviazione standard al PRE erano 4.12 ± 10.47 per il Braccio A, 8.41 ± 22.71 per il Braccio B, 0.85 ± 1.00 per il Braccio C e 10.54 ± 29.72 per il Braccio D. Il confronto al basale tra i quattro bracci di trattamento non ha evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa (analisi della varianza a una via, $p = 0,729$). L'elevata variabilità osservata nei Bracci A, B e D è stata in larga misura determinata da valori individuali marcatamente elevati. Al T1, i valori medi $\pm$ deviazione standard erano 0.00 ± 0.00 per il Braccio A, 0.07 ± 0.09 per il Braccio B, 4.34 ± 7.07 per il Braccio C e 1.12 ± 2.85 per il Braccio D. Il confronto tra PRE e T1 ha evidenziato una riduzione statisticamente significativa dei valori di TExh nella coorte complessiva ($p = 0,020$). I valori medi $\pm$ deviazione standard all'EOT erano 0.07 ± 0.08 per il Braccio A, 0.15 ± 0.20 per il Braccio B, 0.14 ± 0.13 per il Braccio C e 0.30 ± 0.43 per il Braccio D. Rispetto al PRE, i T esausti hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa all'EOT nella coorte complessiva ($p < 0,001$).

L'analisi attraverso ANOVA test non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa nei livelli di linfociti T esausti tra i quattro bracci ($p = 0.6875$).

4.5.3 Caratterizzazione di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ per singoli bracci

Per approfondire le variazioni osservate nel compartimento T complessivo, i fenotipi di senescenza e di esaurimento sono stati analizzati separatamente nei linfociti T helper (CD4⁺) e T citotossici (CD8⁺). Tale approfondimento è stato condotto per valutare se le modifiche associate alla terapia interessassero entrambe le sottopopolazioni o fossero prevalentemente riconducibili a uno dei due compartimenti, evidenziando eventuali andamenti non apprezzabili nell'analisi dei linfociti T totali. A tale scopo, le frequenze medie dei linfociti T con fenotipo senescente ed esausto, valutate separatamente nei compartimenti CD4⁺ e CD8⁺, sono state confrontate tra il basale dell'intera coorte e il termine della terapia nei singoli bracci di trattamento. Come mostrato in Figura 18, non sono emerse differenze statisticamente significative né tra i bracci né rispetto ai valori basali. Per ogni grafico sono stati riportati in tabella i valori di media $\pm$ deviazione standard (DS) nei singoli bracci. Questi risultati sono parzialmente coerenti con quanto osservato nell'analisi complessiva dei linfociti T CD3⁺.

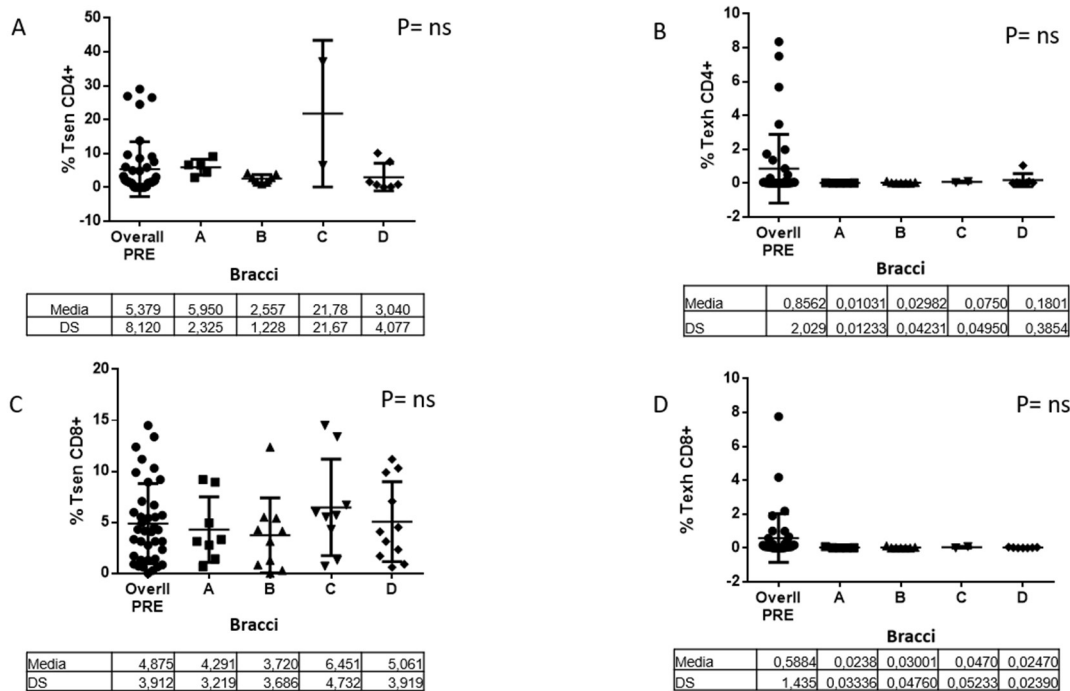


Figura 18: Distribuzione dei linfociti T senescenti CD4⁺ nei singoli bracci (A); Distribuzione dei linfociti T senescenti CD8⁺ nei singoli bracci (B); Distribuzione dei linfociti T esausti CD4⁺ nei singoli bracci (C); Distribuzione dei linfociti T esausti CD8⁺ nei singoli bracci (D). ($p > 0,05$)

4.6 Analisi della frequenza delle sottopopolazioni cellulari in base alla risposta patologica

Al fine di indagare l'associazione tra i biomarcatori circolanti e la risposta alla terapia neoadiuvante, le pazienti sono state suddivise in base all'esito patologico, confrontando quelle che hanno ottenuto una risposta patologica completa (pCR) con quelle che presentavano malattia residua (RD). Per l'analisi abbiamo considerato solo i valori dei linfociti T CD3 senescenti ed esausti e quelli delle M- e PMN-MDSC prima della terapia (Figura 19). Per ogni grafico sono stati riportati in tabella i valori di media $\pm$ deviazione standard (DS) nei singoli bracci.

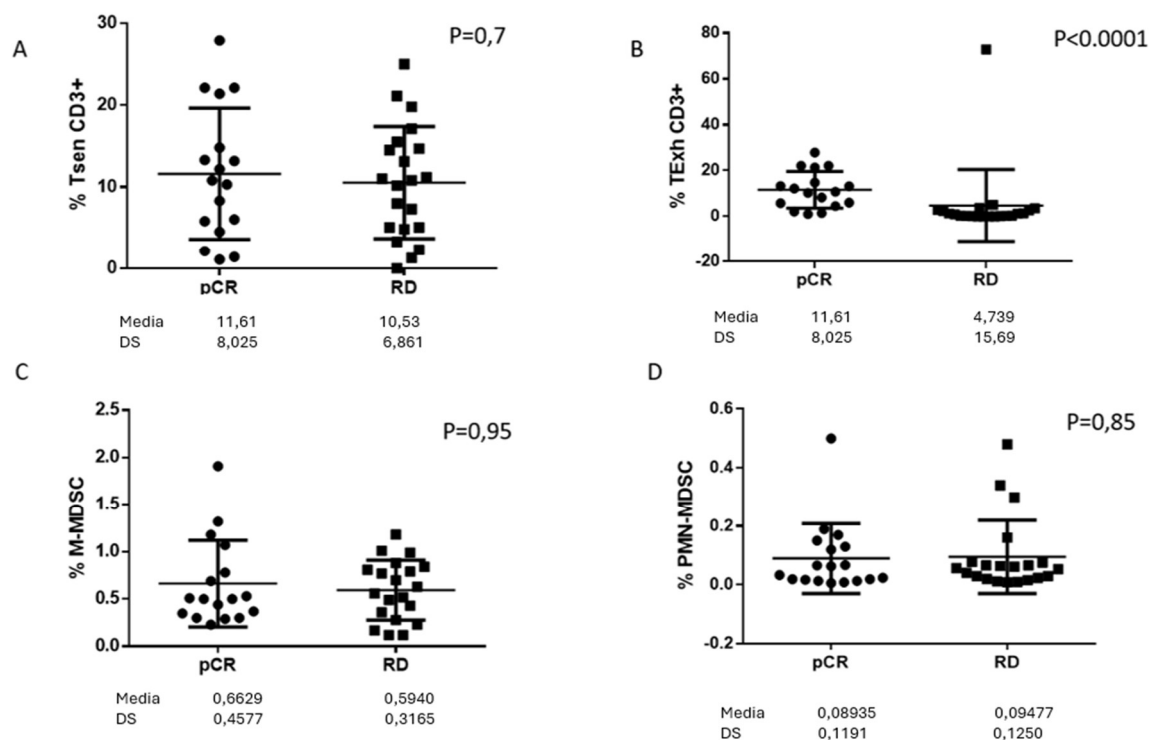


Figura 19: Rappresentazione grafica della frequenza dei biomarcatori nei pazienti con pCR e malattia residua. È emersa una significatività per i linfociti T esausti CD3+ nel gruppo pCR ($p < 0,0001$) (B).

Come mostrato in Figura 19, non sono emerse differenze statisticamente significative tra le pazienti con pCR e quelle con malattia residua, ad eccezione dei linfociti T CD3+ con fenotipo esausto, la cui frequenza basale è risultata maggiore nel gruppo pCR (Figura 19 B; media $\pm$ DS: $p < 0,0001$). Tale associazione potrebbe riflettere la presenza di un compartimento T già antigenicamente stimolato, nel quale l'espressione dei recettori inibitori non coincide necessariamente con una completa compromissione funzionale.

Tuttavia, la sola caratterizzazione fenotipica non consente di stabilire né la funzionalità né la specificità antitumorale di queste cellule. Il risultato suggerisce pertanto una potenziale associazione tra il profilo immunitario basale e la risposta patologica, da confermare in una coorte più ampia.

4.7 Dosaggi di interleuchina-6 (IL-6) e TNF- alpha

Per integrare la caratterizzazione delle sottopopolazioni leucocitarie circolanti con la valutazione del profilo infiammatorio sistemico, sono state misurate le concentrazioni plasmatiche delle citochine pro-infiammatorie IL-6 e TNF- α al basale (PRE) e al termine della terapia neoadiuvante (EOT) (Figura 20). L'analisi è stata condotta per esplorarne le variazioni durante il trattamento e le possibili associazioni con i parametri immunitari.

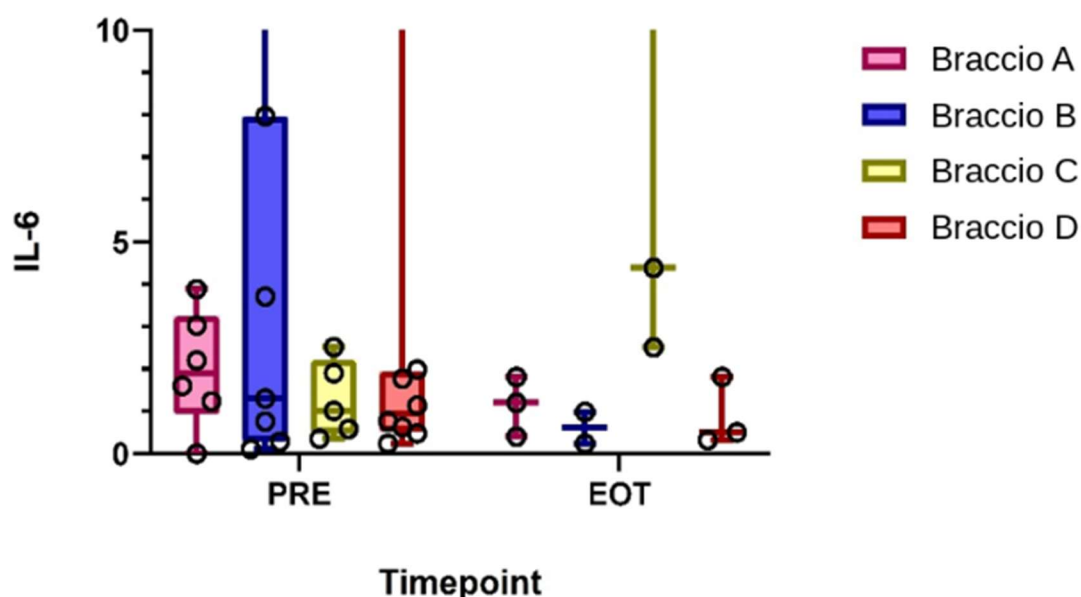


Figura 20: Distribuzione di IL-6 plasmatica al PRE e POST. NB: tre valori superano l'intervallo dell'asse y rappresentato e pertanto non vengono visualizzati: 16.16 (PRE, braccio B), 333.33 (PRE, braccio D) e 22.55 (EOT, braccio C). Disponibilità campionaria al PRE: braccio A n=6; braccio B n= 7; braccio C n= 5; braccio D n=8. Disponibilità campionaria all'EOT: braccio A n=3; braccio B n= 2; braccio C n= 3; braccio D n=3. (p= ns).

Al PRE, i valori medi $\pm$ deviazione standard erano 1.99 ± 1.37 per il Braccio A, 4.33 ± 5.91 per il Braccio B, 1.27 ± 0.91 per il Braccio C e 42.54 ± 117.50 per il Braccio D. Al PRE non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa nei livelli di interleuchina-6 tra i quattro bracci di trattamento (analisi della varianza a una via, $p = 0,5806$). All'EOT, le

concentrazioni di interleuchina-6 sono rimaste generalmente basse nei Bracci A, B e D, con valori medi $\pm$ deviazione standard rispettivamente pari a $1,14 \pm 0,71$, $0,62 \pm 0,53$ e $0,88 \pm 0,81$. Il Braccio C ha mostrato una maggiore variabilità, con una media $\pm$ deviazione standard pari a $9,82 \pm 11,07$, che rifletteva la presenza di valori individuali più elevati ($p=0.2662$).

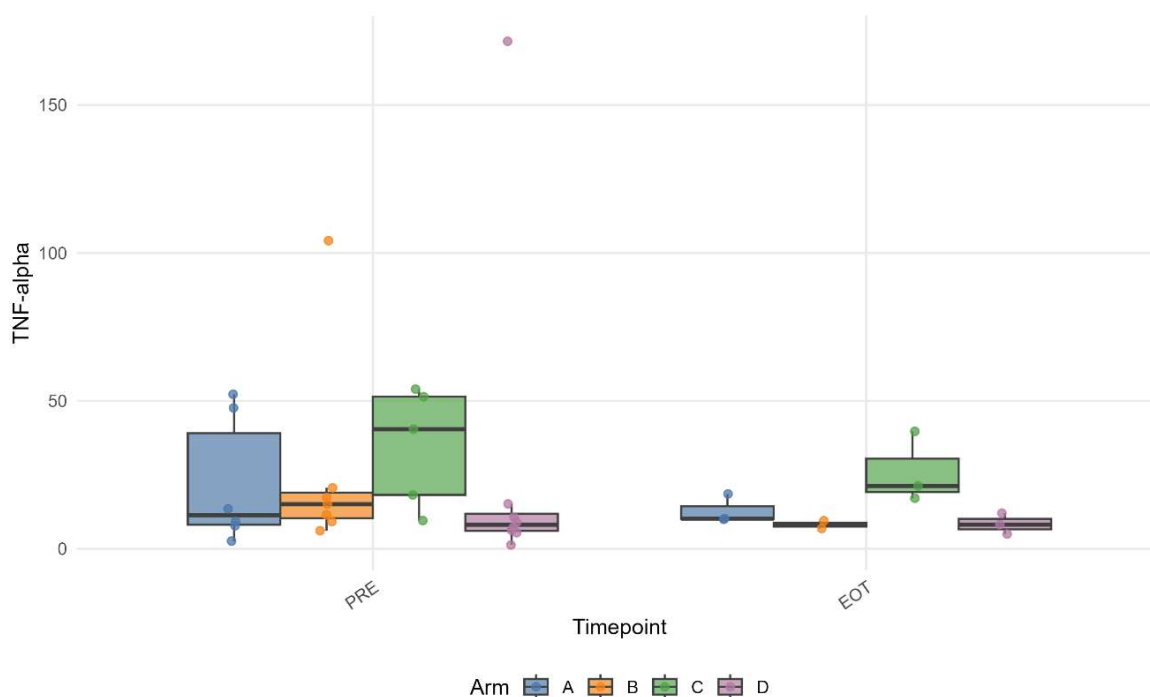


Figura 21: Distribuzione di TNF- α plasmatico al PRE e POST. Disponibilità campionaria al PRE: braccio A $n=6$; braccio B $n=7$; braccio C $n=5$; braccio D $n=8$. Disponibilità campionaria all'EOT: braccio A $n=3$; braccio B $n=2$; braccio C $n=3$; braccio D $n=3$. ($p=0,0659$).

Al PRE, il dosaggio di TNF- α era disponibile per 26 pazienti, (Figura 21: media $\pm$ DS = 27.58 ± 37.52). Al PRE non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa nelle concentrazioni di TNF- α tra i quattro bracci di trattamento (analisi della varianza a una via, $p=0,9624$). All'EOT, le misurazioni erano disponibili per 11 pazienti, (Figura 21: media $\pm$ DS = 14.39 ± 9.81). Anche all'EOT non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa tra i quattro bracci di trattamento (analisi della varianza a una via, $p=0,0659$). Non sono state dimostrate significative modulazioni nei livelli di IL-6 e TNF- α , né considerando l'intera popolazione di studio (IL-6: media $\pm$ DS =ns; TNF- α : media $\pm$ DS = $0,0659$) né tra i singoli bracci.

I risultati mostrano una riduzione delle concentrazioni plasmatiche di IL-6 e TNF- α al termine della terapia rispetto al basale, con un andamento concordante in tutti i bracci dello studio. Tuttavia, la limitata numerosità campionaria impone cautela nell'interpretazione di queste osservazioni e non consente di trarre conclusioni definitive sul contributo dei singoli interventi.

4.7.1 Valutazione delle correlazioni tra le cellule T senescenti ed esauste, MDSC e livelli plasmatici di IL-6 e TNF α

Per esplorare la relazione tra il profilo immunitario circolante e lo stato infiammatorio sistemico, abbiamo messo a confronto le frequenze dei linfociti Tsen e Texh, delle M-MDSC e delle PMN-MDSC con le concentrazioni plasmatiche di IL-6 e TNF- α . L'analisi è stata condotta sui dati basali (PRE), considerando la coorte nel suo complesso, senza suddivisione per braccio di trattamento, a causa del basso numero di campioni. Sono state incluse esclusivamente le 26 pazienti per le quali erano disponibili sia la caratterizzazione immunofenotipica sia la misurazione delle citochine plasmatiche al basale.

Come prima cosa abbiamo valutato se vi fosse una correlazione tra le sottopopolazioni Tsen e Texh e tra IL-6 e TNF α (Figura 22 A e B, rispettivamente). Questo perché è stato dimostrato in altri studi (Ref: Han J. et al., 2026) che tra Tsen e Texh non vi è una netta correlazione, mentre tra IL-6 e TNF α (Ref: Ciurescu, S. et al. 2025) è stata dimostrata una correlazione.

L'analisi dei dati al basale non ha evidenziato una correlazione statisticamente significativa tra le frequenze dei linfociti T con fenotipo senescente ed esausto come atteso (Figura 22A). Questo risultato suggerisce che, nella coorte analizzata, i due fenotipi non mostrino un andamento strettamente concordante, pur non consentendo di concludere che siano indipendenti. Al contrario, le concentrazioni plasmatiche di IL-6 e TNF- α hanno mostrato una correlazione positiva e statisticamente significativa (Figura 22B), indicando che le pazienti con livelli più elevati di una citochina tendevano a presentare livelli più elevati anche dell'altra. Tale associazione è compatibile con una variazione coordinata dei due mediatori nel contesto del profilo infiammatorio sistemico basale, senza tuttavia dimostrare un rapporto causale tra essi.

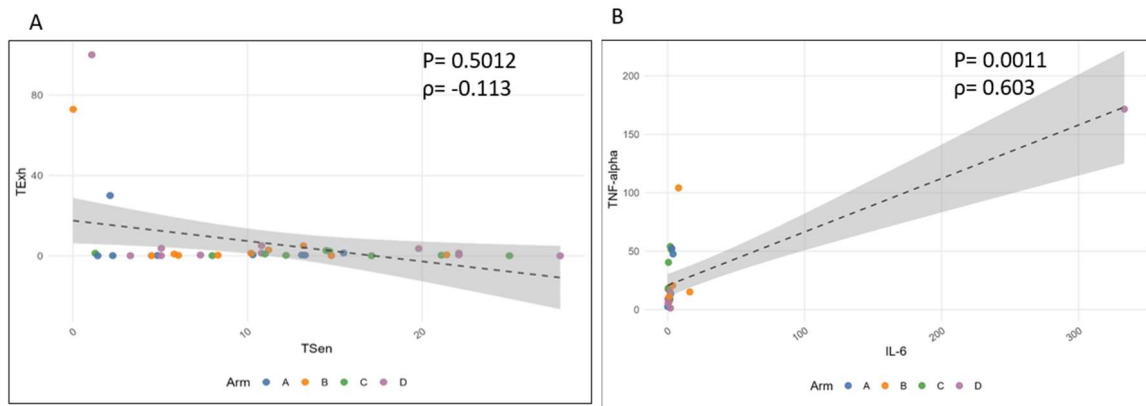


Figura 22: diagrammi di dispersione che mostrano le correlazioni tra cellule T senescenti ed esauste, $n = 38$ (A) e la correlazione tra TNF α e IL-6, $n = 26$ (B).

Successivamente abbiamo analizzato se vi fosse una correlazione tra MDSC e livelli plasmatici di IL6 e TNF α . Come si può notare in figura 23 D, abbiamo evidenziato una significativa correlazione solo tra la frequenza delle PMN-MDSC e i livelli di TNF- α : le pazienti con frequenze più elevate di queste cellule presentavano concentrazioni inferiori della citochina (Figura 23 D). Tale correlazione inversa potrebbe essere compatibile con l'attività immunosoppressiva di queste cellule. In altri contesti patologici sono state infatti descritte sia associazioni inverse tra PMN-MDSC circolanti e TNF- α plasmatico, sia una riduzione della produzione di TNF- α da parte dei linfociti T in presenza di PMN-MDSC (Ref: Li X. et al., 2021). Queste evidenze offrono un possibile razionale biologico per il risultato osservato, senza tuttavia dimostrare che il medesimo meccanismo operi nella nostra coorte. La natura correlativa dell'analisi e l'assenza di saggi funzionali non consentono infatti di attribuire alle PMN-MDSC un effetto diretto sui livelli plasmatici della citochina.

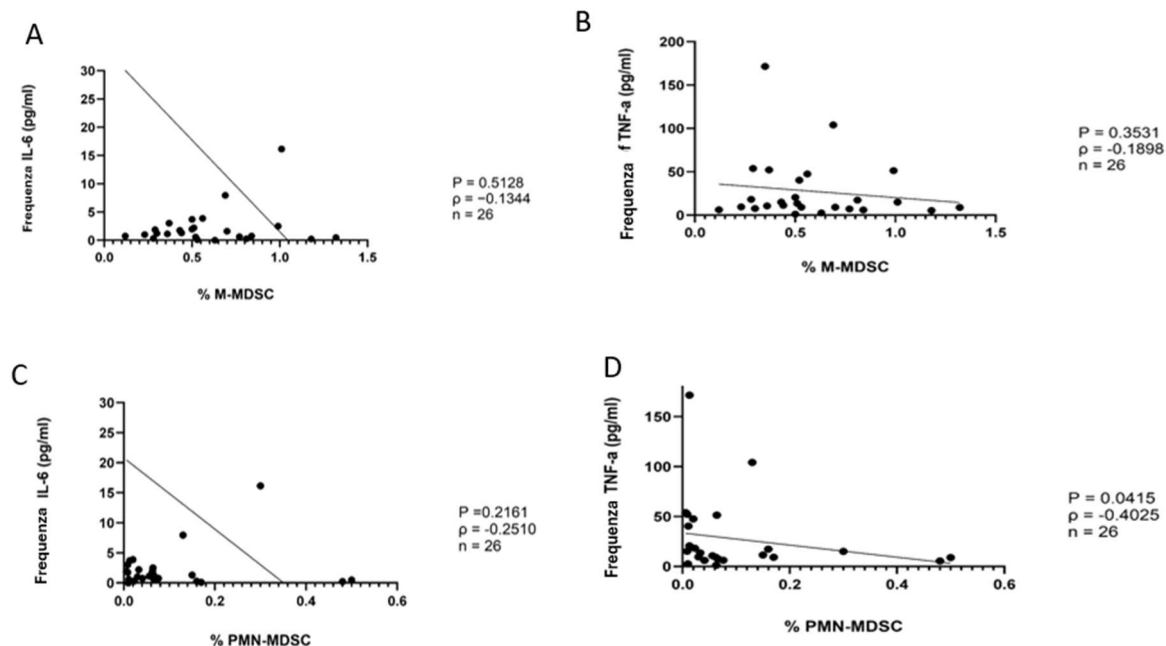


Figura 23: correlazioni tra MDSC e i livelli plasmatici di IL6 e TNF α . Correlazione tra IL-6 e M-MDSC (A); correlazione tra TNF α e M-MDSC (B); correlazione tra IL-6 e PMN-MDSC (C); correlazione tra TNF α e PMN-MDSC (D).

Infine, abbiamo correlato i livelli di IL6 e TNF α anche con le cellule T senescenti ed esauste, dimostrando che non ci sono apparentemente correlazioni tra comparto immunitario e citochine pro-infiammatorie (figura 24).

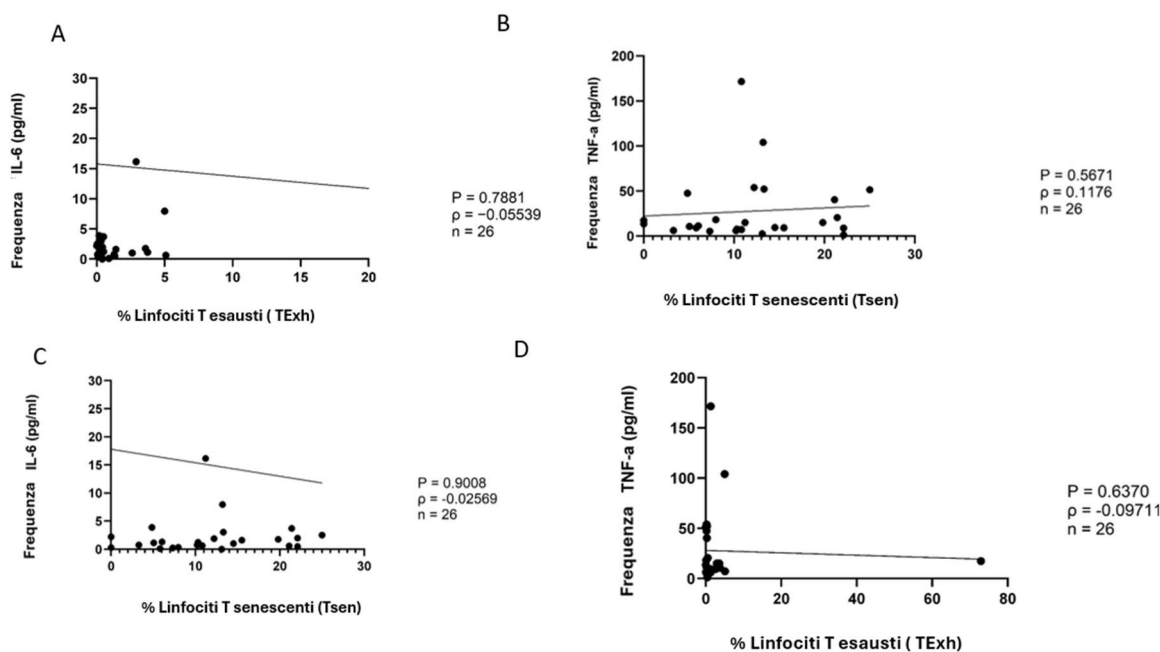


Figura 24: correlazioni tra i livelli plasmatici di IL6 e TNF α e le cellule T senescenti ed esauste. Correlazione tra IL-6 e TExh (A); correlazione tra TNF α e Tsen (B); correlazione tra IL-6 e Tsen (C); correlazione tra TNF α e TExh (D).

4.7.2 Analisi della correlazione tra i biomarcatori in base alla risposta al trattamento

Per esplorare se le associazioni tra il profilo immunitario e quello infiammatorio al basale presentassero andamenti differenti in relazione alla risposta, abbiamo condotto le stesse analisi di correlazione dividendo i pazienti in due gruppi in base al tipo risposta: quei pazienti che hanno ottenuto una risposta patologica completa (pCR) e in quelli con malattia residua (RD). Abbiamo considerato 25 pazienti, in quanto per una delle 26 considerate nell'analisi precedente non abbiamo ancora avuto l'esito della risposta. Come osservabile dai dati in tabella 9, non ci sono correlazioni significative. Tale risultato potrebbe risentire della riduzione della numerosità campionaria conseguente alla suddivisione in sottogruppi, che limita la potenza statistica e la precisione delle stime, nonché di una diversa distribuzione dei valori all'interno dei due gruppi. L'assenza di significatività non consente pertanto di escludere la presenza di associazioni biologicamente rilevanti, ma indica la necessità di verificarne la consistenza in una coorte più ampia.

Tabella 9: Analisi esplorativa del confronto tra biomarcatori immunitari e infiammatori in base alla risposta al trattamento (pCR= risposta patologica completa vs RD=residual disease-malattia residua). Per ciascuna coppia di biomarcatori sono riportate le dimensioni del campione (N), i valori di P e i coefficienti di correlazione (r). Complessivamente, non sono state osservate correlazioni statisticamente significative in nessuno dei due gruppi di risposta.

	PCR			RD		
Correlazione tra i biomarcatori	N	p-value	r	N	p-value	r
Tsen vs IL-6	10	0.4197	0.2857	15	0.3748	0.2464
Tsen vs TNF-a	10	0.6487	-0.1641	15	0.4983	0.1893
Texh vs IL-6	10	0.765	0.1094	15	0.9438	-0.02143
Texh vs TNF-a	10	0.765	0.1094	15	0.4819	-0.1964
M-MDSC vs IL-6	11	0.4684	0.2455	15	0.7947	-0.07335
M-MDSC vs TNF-a	11	0.7345	-0.1182	15	0.9974	-0.00179
PMN-MDSC vs IL-6	10	0.0773	-0.5897	15	0.9847	-0.00714
PMN-MDSC vs TNF-a	10	0.1737	-0.4681	15	0.4421	-0.2143

5. Discussione

Il carcinoma mammario rappresenta il tumore più frequentemente diagnosticato e, secondo i dati AIOM (2023), rappresenta circa il 30% di tutti i tumori femminili in Italia. Risulta essere la principale causa di morte oncologica nella popolazione femminile, tuttavia, grazie al miglioramento delle terapie, la sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi è pari all'88%, uno dei tassi più alti d'Europa, percentuale che supera anche il 90% nel caso in cui la malattia venga diagnosticata precocemente negli stadi iniziali, elemento chiave che aumenta di molto le possibilità di guarigione. L'integrazione dello stadio anatomico, delle caratteristiche patologiche, del sottotipo molecolare, del profilo multigenico e dei fattori specifici del paziente, consente di assegnare uno stadio clinico e prognostico più raffinato, che serve come base per la stratificazione individuale del rischio e guida le decisioni terapeutiche iniziali, al fine di migliorare la gestione della malattia e la qualità di vita delle pazienti. Talvolta anche il raggiungimento della risposta patologica completa (pCR) rimane una sfida importante: i pazienti con sindrome metabolica (caratterizzata da un alto BMI e insulino-resistenza) spesso mostrano tassi di pCR subottimali (Ref: Zhou Z. et al., 2023). Questo è in parte attribuito a uno "scudo immunitario" metabolico composto da cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC) che proteggono il tumore dalla morte indotta dalla chemioterapia.

Il presente lavoro di tesi si inserisce nell'ambito dello studio clinico NEOMET, volto a valutare l'effetto dell'esercizio fisico e della supplementazione con acidi grassi omega-3, singolarmente o in combinazione, sulla risposta alla terapia neoadiuvante nelle pazienti con carcinoma mammario operabile. Il razionale dello studio si fonda sull'ipotesi che le alterazioni metaboliche e l'infiammazione cronica possano compromettere la funzionalità del sistema immunitario e contribuire alla resistenza ai trattamenti antitumorali. In questo contesto, le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC), i linfociti T con fenotipo senescente o esausto e le citochine proinfiammatorie possono rappresentare dei parametri per caratterizzare lo stato immunitario sistemico e indagarne l'associazione con la risposta terapeutica.

Le evidenze in letteratura indicano che il contesto metabolico può influenzare la funzionalità delle cellule immunitarie e la loro capacità di sostenere la risposta antitumorale. In particolare, studi preclinici hanno mostrato che le alterazioni del metabolismo lipidico possono contribuire alla senescenza e all'esaurimento dei linfociti T e che la loro modulazione può migliorare l'attività antitumorale e l'efficacia dell'immunoterapia (Xingzhe

et al., 2019; Liu et al., 2021). In ambito clinico, uno studio randomizzato condotto in pazienti con carcinoma mammario non ancora trattate ha documentato modificazioni del profilo degli acidi grassi plasmatici e il mantenimento delle percentuali di linfociti T CD4⁺ e dei livelli di proteina C-reattiva nel gruppo di pazienti a cui era stato dato in supplemento alla terapia EPA e DHA, suggerendo un possibile ruolo immunomodulatore di questi nutrienti (Paixão et al., 2017).

Inoltre, è stato osservato che una singola sessione di esercizio fisico può mobilitare i linfociti T CD8⁺ e le cellule NK nel sangue periferico e ridurre la proporzione relativa delle MDSC nelle pazienti con carcinoma mammario (Koivula et al., 2024).

Sulla base di queste premesse, il presente lavoro di tesi si configura come un'analisi preliminare nell'ambito dello studio NEOMET. Tale analisi si inserisce in una prospettiva più ampia, la cui finalità generale è contribuire al miglioramento degli esiti clinici delle pazienti attraverso due obiettivi complementari: da un lato, identificare potenziali biomarcatori circolanti da integrare in un modello predittivo di risposta alla terapia neoadiuvante, che possa in futuro supportare il monitoraggio e la personalizzazione del trattamento; dall'altro, valutare se l'esercizio fisico e la supplementazione con acidi grassi omega-3 possano favorire un profilo immunometabolico meno pro-infiammatorio, contribuendo a migliorare la risposta terapeutica. A tale scopo lo studio prevede la randomizzazione dei pazienti con carcinoma mammario operabile in quattro bracci: braccio A, solo terapia neoadiuvante (NAT) come da prassi clinica; braccio B, che prevede la supplementazione con acidi grassi omega-3 alla NAT; braccio C, che prevede l'esercizio fisico supervisionato; braccio D, combinazione degli interventi previsti dai bracci B e C. Ciascun intervento è stato associato alla NAT come da indicazioni cliniche. Dato che evidenze cliniche relative al miglioramento della risposta patologica rimangono eterogenee quando associate ai possibili benefici della supplementazione con omega-3, dell'esercizio fisico o della loro combinazione sono richiesti ulteriori approfondimenti. Tuttavia, sfruttando gli effetti immunomodulatori degli Omega 3, si potrebbe avere come effetto quello di "ringiovanire" il sistema immunitario, riducendo così l'esaurimento dei linfociti T e migliorando la risposta clinica alla terapia neoadiuvante. Questo perché anche le cellule del sistema immunitario possono andare incontro a senescenza o esaurimento, condizioni che ne riducono o ne bloccano l'attività antitumorale e favoriscono l'instaurarsi di un ambiente immunosoppressivo che contribuisce al mantenimento di uno stato infiammatorio cronico e alla compromissione della risposta immunitaria.

I linfociti T senescenti ed esausti condividono alcune caratteristiche fenotipiche e funzionali, tra cui una ridotta capacità proliferativa e citotossica e un maggior arresto del ciclo cellulare. Tuttavia, i due stati presentano profili molecolari, citochinici e trascrizionali distinti. Nell'ambito del carcinoma alla mammella, è stato dimostrato che l'accumulo di linfociti T esausti è associato ad una prognosi più sfavorevole e ad una minor risposta ai trattamenti (ref: I. J. Rodriguez et al., 2023). Nel nostro studio abbiamo dimostrato che nel gruppo di pazienti che rispondono alla terapia, i valori di linfociti T esausti al basale sono significativamente più elevati rispetto a quelli che non rispondono. Questo risultato non implica un ruolo favorevole dell'esaurimento funzionale, ma potrebbe riflettere la presenza di una risposta immunitaria preesistente accompagnata dall'espressione di recettori inibitori. Nel carcinoma mammario, infatti, Egelston et al. (2018) hanno dimostrato che i linfociti T CD8⁺ infiltranti il tumore possono conservare funzioni effettrici nonostante l'espressione di PD-1. Inoltre, Liang et al. (2020) hanno osservato una maggiore presenza di T PD-1⁺CD8⁺ nelle biopsie tumorali pretrattamento delle pazienti che raggiungevano la pCR dopo terapia neoadiuvante (ref: Liang H et al., 2020; ref2: Egelston CA et al., 2018). Sebbene queste evidenze riguardino il compartimento tumorale, sostengono la possibilità che l'espressione di marcatori associati all'esaurimento identifichi anche popolazioni coinvolte in una risposta antitumorale attiva. L'interpretazione del nostro risultato rimane tuttavia esplorativa e richiede conferma mediante analisi funzionali e in coorti più ampie, tenendo conto del sottotipo tumorale e del trattamento ricevuto.

Le cellule tumorali a loro volta rilasciano citochine e fattori di crescita che alterano la normale produzione di cellule del sangue, modificando lo sviluppo delle cellule staminali del sangue all'interno del midollo osseo e in altri organi linfatici. Queste cellule alterate, anziché trasformarsi in macrofagi o neutrofili attivi, interrompono il loro sviluppo, causando un aumento di cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC). Esse, che normalmente rappresentano un importante meccanismo fisiologico di regolazione della risposta immunitaria, se espanse, sono indicatori di prognosi sfavorevole in quanto il loro accumulo favorisce l'immunosoppressione e possono contribuire alla resistenza alla chemioterapia neoadiuvante. Le M-MDSC e le PMN-MDSC possono contribuire ulteriormente alla soppressione dell'attività linfocitaria, favorendo un ambiente immunitario permissivo alla persistenza e alla progressione tumorale (ref: Speigl L, et al., 2017; ref2: Mehmeti-Ajradini M, et al., 2020). Sebbene la letteratura attribuisca alle M-MDSC e alle PMN-MDSC un ruolo nella soppressione della risposta immunitaria antitumorale, nella nostra coorte non sono

emerse differenze statisticamente significative nelle loro frequenze basali tra le pazienti con pCR e quelle con malattia residua. I risultati ottenuti non consentono quindi di sostenere il loro impiego come biomarcatori di risposta alla terapia neoadiuvante in questo contesto. Tuttavia, la limitata numerosità campionaria e la variabilità dei dati potrebbero aver ridotto la capacità di rilevare eventuali associazioni, che richiedono ulteriori valutazioni in una coorte più ampia.

Considerata la natura dinamica delle interazioni tra immunosoppressione, infiammazione e trattamento, alle valutazioni basali e di fine terapia (EOT) abbiamo aggiunto anche una valutazione precoce durante la terapia neoadiuvante (NAT), T1, ed effettuata circa due settimane dopo l'inizio della terapia. Mentre le misurazioni basali descrivono il profilo immunitario e infiammatorio prima del trattamento e quelle a EOT documentano le variazioni osservate al suo termine, T1 consente di rilevare modificazioni precoci che potrebbero non essere più evidenti nella valutazione finale. Questo campionamento intermedio permette quindi di descrivere più accuratamente l'andamento delle popolazioni immunitarie circolanti e di esplorare l'eventuale associazione tra le loro variazioni iniziali e la risposta patologica successivamente valutata alla chirurgia. La scelta di T1 è coerente con studi sul carcinoma mammario che hanno esaminato risposte biologiche precoci intorno al quindicesimo giorno o dopo il primo ciclo di trattamento, pur considerando biomarcatori differenti e, in alcuni casi, il tessuto tumorale anziché il sangue periferico (ref: Sux X et al., 2022.; ref2: Nuciforo P. et al, 2018.).

Nella nostra coorte, la valutazione a T1 ha evidenziato una marcata riduzione precoce della frequenza dei linfociti T senescenti circolanti (TSen), definiti dal fenotipo CD28⁻CD57⁺KLRG1⁺. Tale riduzione è risultata statisticamente significativa sia nella coorte complessiva sia in ciascuno dei quattro bracci di trattamento. Al termine della terapia, tuttavia, sono emersi andamenti individuali differenti: in alcune pazienti le frequenze dei TSen si sono mantenute basse, mentre in altre sono nuovamente aumentate. Di conseguenza, il confronto complessivo tra basale ed EOT non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa. Anche la frequenza dei linfociti T con fenotipo esausto (TExh) si è ridotta significativamente a T1 nella coorte complessiva, mantenendosi inferiore ai valori basali al termine del trattamento.

Questi risultati mostrano che le due popolazioni, identificate sulla base del loro fenotipo, presentano andamenti temporali differenti e sottolineano il contributo informativo del campionamento precoce. Un confronto limitato al basale e a EOT non avrebbe infatti

permesso di rilevare la marcata riduzione iniziale dei TSen, che non si è mantenuta uniformemente fino al termine della terapia.

La diminuzione precoce dei TSen in tutti e quattro i bracci, compreso quello trattato con la sola NAT, è compatibile con una modifica associata al trattamento neoadiuvante e condivisa dalla coorte. Non è invece possibile attribuire tale andamento specificamente alla supplementazione con omega-3 o all'esercizio fisico. Per dimostrare un effetto aggiuntivo degli interventi sarebbe necessario confrontare direttamente le variazioni nel tempo tra i bracci: la presenza di cambiamenti significativi all'interno dei singoli gruppi non è sufficiente a stabilire una differenza tra gli interventi. Sebbene a EOT siano state osservate differenze descrittive nelle frequenze dei TSen tra i bracci, queste non hanno raggiunto la significatività statistica. Il numero limitato di campioni disponibili in alcuni gruppi potrebbe condizionare l'interpretazione. I risultati attuali, pertanto, non dimostrano un effetto specifico degli interventi, ma non consentono neppure di escluderne un possibile contributo.

Dal punto di vista biologico, la riduzione della frequenza delle cellule con fenotipo senescente o esausto non deve essere interpretata come una dimostrazione del recupero della funzionalità dei linfociti T. Le variazioni delle frequenze relative possono riflettere modificazioni nella composizione del compartimento T circolante e le analisi effettuate non consentono di distinguere un recupero funzionale da cambiamenti nell'abbondanza o nella distribuzione delle cellule. La modulazione precoce rilevata a T1 evidenzia comunque l'utilità di valutare l'immunità sistemica durante il trattamento, oltre che prima del suo inizio e al suo termine. Saranno necessarie analisi longitudinali in una coorte più ampia e con adeguata potenza statistica per chiarire se tali variazioni precoci siano associate al successivo raggiungimento della pCR e se gli interventi NEOMET ne influenzino l'entità o la persistenza.

L'analisi separata dei compartimenti T CD4⁺ e CD8⁺ trova supporto in studi che hanno documentato una diversa modulazione dei marcatori di esaurimento e senescenza nelle due sottopopolazioni durante la chemioterapia neoadiuvante. Wesolowski et al. (2020) hanno osservato una riduzione dell'espressione di diversi checkpoint nei CD4⁺ circolanti e un incremento di alcuni di essi nei CD8⁺, evidenziando come l'analisi dei linfociti T totali possa mascherare andamenti differenti. Rodríguez et al. (2023) hanno inoltre descritto variazioni dei marcatori di esaurimento dopo il trattamento e differenze nella distribuzione dei marcatori di senescenza tra i due compartimenti. Queste evidenze sostengono l'utilità di una caratterizzazione distinta dei CD4⁺ e dei CD8⁺. Nella nostra coorte, tuttavia, non sono emerse

differenze statisticamente significative tra i bracci a EOT né rispetto al riferimento basale. Tale risultato non esclude la rilevanza biologica delle sottopopolazioni analizzate, ma richiede ulteriori approfondimenti mediante confronti longitudinali in una coorte più ampia. Rispetto alle modifiche precoci osservate nelle popolazioni T, le M-MDSC hanno mostrato un andamento longitudinale meno uniforme. Il confronto complessivo tra PRE e T1 non ha raggiunto la significatività statistica, sebbene i valori medi differissero tra i bracci e in alcuni gruppi fosse presente un incremento descrittivo. Questi dati non consentono quindi di affermare che la frequenza delle M-MDSC sia stata significativamente modulata già nelle prime fasi della terapia. Al termine della terapia, la frequenza media risultava superiore al basale nei bracci A, B e C, mentre nel braccio D era inferiore. L'aumento descrittivo più marcato è stato osservato nel braccio B, sottoposto a supplementazione con DHA/EPA. Tuttavia, il confronto complessivo tra PRE ed EOT non è risultato statisticamente significativo. Gli andamenti osservati suggeriscono una possibile eterogeneità delle variazioni tra i gruppi, ma non consentono di attribuire alla supplementazione un incremento delle M-MDSC circolanti. La ridotta disponibilità di misurazioni e l'elevata variabilità interindividuale limitano ulteriormente questa interpretazione.

L'infiammazione cronica e l'alterazione della risposta immunitaria antitumorale sono processi strettamente interconnessi. In modelli sperimentali, è stato dimostrato che IL-6 e TNF- α sono coinvolti nella regolazione dell'attività immunosoppressiva delle MDSC, attraverso interazioni che possono favorire la progressione tumorale (Oh et al., 2013; Zhao et al., 2012; Hu et al., 2014). Queste evidenze forniscono il razionale per indagare congiuntamente il profilo infiammatorio e quello immunitario, senza presupporre una relazione diretta tra livelli plasmatici delle citochine e frequenze cellulari. Abbiamo dimostrato una correlazione tra la frequenza delle PMN-MDSC e la concentrazione di TNF- α . Uno studio pubblicato nel 2021 dimostra la stessa associazione inversa tra le PMN-MDSC LOX1⁺ circolanti e i livelli plasmatici di TNF- α correlazione (Ref: Li X. et al., 2021). Tale evidenza riguarda tuttavia pazienti con trauma e una popolazione caratterizzata anche mediante il marcatore LOX1; pertanto, non è direttamente sovrapponibile alla nostra coorte. Pur nelle differenze tra i due contesti clinici e nella caratterizzazione delle popolazioni analizzate, ipotizziamo che l'associazione inversa osservata possa riflettere il coinvolgimento delle PMN-MDSC nella regolazione della risposta infiammatoria sistemica. In particolare, la loro attività immunosoppressiva potrebbe contribuire a limitare la produzione di TNF- α da parte delle cellule immunitarie, senza necessariamente favorire una

risposta antitumorale efficace. L'interpretazione di questo risultato deve considerare la complessità delle interazioni tra TNF- α e MDSC e tale spiegazione rimane tuttavia un'ipotesi, poiché non sono stati effettuati saggi funzionali né identificate le fonti cellulari della citochina. È inoltre necessario distinguere la concentrazione plasmatica di TNF- α solubile dall'attività della forma transmembrana e dalla segnalazione locale nel microambiente tumorale. La correlazione potrebbe risentire anche della composizione cellulare e di altri fattori clinici o immunologici. Il dato non consente pertanto di stabilire la direzione dell'eventuale relazione causale, ma offre un razionale per approfondirla attraverso analisi funzionali. Considerando la numerosità campionaria e il numero di correlazioni esaminate, il risultato mantiene un carattere esplorativo; la sua robustezza dovrà essere valutata mediante correzione per confronti multipli e conferma in una coorte indipendente. Inoltre, studi funzionali hanno dimostrato anche che le PMN-MDSC isolate dal midollo osseo dei pazienti riducevano l'espressione di TNF- α nei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ in cocultura (Ref: Bhardwaj V. et al., 2024). Potrebbe quindi essere interessante valutare le sottopopolazioni di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ in relazione ai livelli di TNF- α e capire se un comparto piuttosto che un altro sia più informativo. Inoltre, aumentando la numerosità e quindi i soggetti nei vari bracci, capire se i trattamenti possono o meno modulare il profilo sia immunitario che citochinico e quindi l'andamento della risposta al trattamento.

In questo quadro si inserisce la correlazione positiva osservata al basale tra i livelli circolanti di IL-6 e TNF- α , compatibile con l'attivazione di processi infiammatori interconnessi prima dell'inizio della terapia neoadiuvante. Tale associazione trova riscontro in precedenti osservazioni nelle pazienti con carcinoma mammario ed è biologicamente plausibile alla luce della capacità del TNF- α di stimolare la produzione di IL-6. Pur non consentendo di stabilire una relazione causale, questo risultato sostiene l'interesse per una valutazione congiunta delle due citochine nella caratterizzazione del profilo infiammatorio sistemico e nello studio delle sue variazioni durante il trattamento e gli interventi previsti da NEOMET.

6. Conclusioni

Questo studio mette in luce la complessità e soggettività della risposta immunitaria sistemica nelle pazienti con carcinoma mammario sottoposte a terapia neoadiuvante. I risultati evidenziano un precoce rimodellamento dei linfociti T senescenti ed esausti e una marcata variabilità delle popolazioni mieloidi soppressorie e delle citochine pro-infiammatorie durante il trattamento. La caratterizzazione dei biomarcatori esaminati potrebbe contribuire a descrivere lo stato immunitario delle pazienti e le sue modifiche nel corso della terapia. In prospettiva, il monitoraggio di questi biomarcatori potrebbe aiutare a identificare precocemente differenti profili di risposta immunologica e a valutare la loro eventuale associazione con l'efficacia del trattamento.

Il dato più significativo è emerso dall'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie dopo l'inizio del trattamento, la quale ha evidenziato una maggiore frequenza di linfociti T esausti nei pazienti che hanno successivamente raggiunto una risposta patologica completa (pCR) rispetto a quelli con malattia residua (RD), il che potrebbe riflettere una più intensa stimolazione immunitaria, potenzialmente associata ad una migliore risposta terapeutica.

Tuttavia, i dati ottenuti non consentono ancora di attribuire un valore prognostico o predittivo affidabile ai biomarcatori analizzati, né di distinguere gli effetti specifici della supplementazione con DHA/EPA e dell'esercizio fisico da quelli della terapia neoadiuvante, comune a tutti i bracci. Saranno pertanto necessari studi condotti su coorti più ampie, con un campionamento longitudinale completo, valutazioni funzionali e modelli statistici adeguati, per stabilire se questi parametri possano essere utilizzati come biomarcatori della risposta terapeutica e contribuire alla personalizzazione del trattamento nelle pazienti con carcinoma mammario.

Bibliografia

- Akbar AN, Henson SM, Lanna A. *Senescence of T Lymphocytes: Implications for Enhancing Human Immunity*. Trends Immunol. 2016 Dec;37(12):866-876. doi: 10.1016/j.it.2016.09.002. Epub (2016) Oct 4. PMID: 27720177.
- Aliazis K, Yenyuwadee S, Phikulsod P, Boussiotis VA. *Emergency myelopoiesis in solid cancers*. Br J Haematol. 2024 Sep;205(3):798-811. doi: 10.1111/bjh.19656. Epub (2024) Jul 23. PMID: 39044285; PMCID: PMC11610632.
- American Cancer Society. *Breast Cancer Facts & Figures 2024–2025*. Atlanta: American Cancer Society, Inc.; (2024).
- Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershewald JE, Brookland RK, Meyer L, Gress DM, Byrd DR, Winchester DP. The Eighth Edition AJCC *Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging*. CA Cancer J Clin. 2017 Mar;67(2):93-99. doi: 10.3322/caac.21388. Epub (2017) Jan 17. PMID: 28094848.
- Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM). *Linee guida: carcinoma mammario in stadio precoce*. Edizione 2023, aggiornata al 20 novembre 2023. Roma: Sistema Nazionale Linee Guida, Istituto Superiore di Sanità; 2024. https://www.iss.it/documents/20126/8403839/LG_C0013_AIOM_Ca-mammario-precoce.pdf
- Bai D, Zhou Y, Jing L, Guo C, Yang Q. *Arginine Metabolism in Cancer Biology and Immunotherapy*. Immune Netw. (2025) Aug 12;25(4):e30. doi: 10.4110/in.2025.25.e30. PMID: 40917794; PMCID: PMC12411109.
- Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, Mandelblatt JS, Yakovlev AY, Habbema JD, Feuer EJ; *Cancer Intervention and Surveillance Modeling Network (CISNET) Collaborators*. *Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer*. N Engl J Med. (2005) Oct 27;353(17):1784-92. doi: 10.1056/NEJMoa050518. PMID: 16251534.
- Bhardwaj V, Yang ZZ, Jalali S, Villasboas JC, Mudappathi R, Wang J, Mukherjee P, Paludo J, Tang X, Kim HJ, Krull JE, Wenzl K, Novak AJ, Mondello P, Ansell SM. *Expanded tumor-associated polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in Waldenstrom*

- macroglobulinemia display immune suppressive activity*. Blood Cancer J. 2024 Dec 18;14(1):217. doi: 10.1038/s41408-024-01173-w. PMID: 39695096; PMCID: PMC11655835.
- Blank CU, Haining WN, Held W, Hogan PG, Kallies A, Lugli E, Lynn RC, Philip M, Rao A, Restifo NP, Schietinger A, Schumacher TN, Schwartzberg PL, Sharpe AH, Speiser DE, Wherry EJ, Youngblood BA, Zehn D. *Defining 'T cell exhaustion'*. Nat Rev Immunol. (2019) Nov;19(11):665-674. doi: 10.1038/s41577-019-0221-9. Epub 2019 Sep 30. PMID: 31570879; PMCID: PMC7286441.
- Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. *Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin. 2024 May-Jun;74(3):229-263. Doi: 10.3322/caac.21834. Epub (2024) Apr 4. PMID: 38572751.
- Caffa, I., Spagnolo, V., Vernieri, C. et al. *Fasting-mimicking diet and hormone therapy induce breast cancer regression*. Nature 583, 620–624 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2502-7>
- Campisi, J., D'Adda di Fagagna, F. *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol 8, 729–740 (2007). <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Ciurescu S, Buciu V, Șerban D, Boroza F, Tomescu L, Cobec IM, Ilaș DG, Sas I. *Role of Cytokines in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Biomedicines. 2025 Sep 9;13(9):2203. doi: 10.3390/biomedicines13092203. PMID: 41007766; PMCID: PMC12467893.
- Colditz GA, Bohlke K. *Priorities for the primary prevention of breast cancer*. CA Cancer J Clin. (2014) May-Jun;64(3):186-94. doi: 10.3322/caac.21225. Epub 2014 Mar 19. PMID: 24647877.
- Coppé J., Desprez P., Krtolica A., Campisi J.. *The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression*. (2010) Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease 5:99-118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
- Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, Bonnefoi H, Cameron D, Gianni L, Valagussa P, Swain SM, Prowell T, Loibl S, Wickerham DL, Bogaerts J, Baselga J, Perou C, Blumenthal G, Blohmer J, Mamounas EP, Bergh J, Semiglazov V,

- Justice R, Eidtmann H, Paik S, Piccart M, Sridhara R, Fasching PA, Slaets L, Tang S, Gerber B, Geyer CE Jr, Pazdur R, Ditsch N, Rastogi P, Eiermann W, von Minckwitz G. *Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis*. Lancet. (2014) Jul 12;384(9938):164-72. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62422-8. Epub 2014 Feb 14. Erratum in: Lancet. 2019 Mar 9;393(10175):986. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32772-7. PMID: 24529560.
- Dengxiong Li, Jie Wang, Xinrui Li, Zhipeng Wang, Qingxin Yu, Siang Boon Koh, Ruicheng Wu, Luxia Ye, Yiqing Guo, Uzoamaka Okoli, Alisha Pati-Alam, Eduardo Mota, Wuram Wei, Koo Han Yoo, William C. Cho, Dechao Feng, Susan Heavey (2025) *Interactions between radiotherapy resistance mechanisms and the tumor microenvironment*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, Volume 210.
- Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D. *et al*. *Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities*. Nat Rev Mol Cell Biol **22**, 75–95 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>.
- Dos Santos HWG, Bramante BC, Perez MM, da Veiga GL, Alves BDCA, Fonseca FLA. *Expression Profile of IL-2, IL-6, IL-10, and TNF- α in Breast Tumors*. Int J Mol Sci. (2025) Aug 14;26(16):7841. doi: 10.3390/ijms26167841. PMID: 40869161; PMCID: PMC12386584.
- Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. *Interferons, immunity and cancer immunoediting*. Nat Rev Immunol. (2006); 6(11):836-848.
- Egelston, C.A., Avalos, C., Tu, T.Y. *et al*. *Human breast tumor-infiltrating CD8⁺ T cells retain polyfunctionality despite PD-1 expression*. Nat Commun **9**, 4297 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06653-9>
- Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome*. Nat Rev Cancer. (2012); 12(4):298-306.
- Galluzzi L, Buqué A, Kroemer G. *Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents*. Nat Rev Immunol. (2017a);17(3):151-166.
- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O. *et al*. *Immunosuppressive cell death in cancer*. Nat Rev Immunol **17**, 402 (2017b). <https://doi.org/10.1038/nri.2017.48>

- Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC, Lluch A, Staroslawska E, de la Haba Rodriguez J, Im SA, Pedrini JL, Poirier B, Morandi P, Semiglazov V, Srimuninnimit V, Bianchi G, Szado T, Ratnayake J, Ross G, Valagussa P. *Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial*. *Lancet Oncol.* (2012) Jan;13(1):25-32. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70336-9. Epub 2011 Dec 6. PMID: 22153890.
- Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. *Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer (2013)*. *Ann Oncol.* 2013 Sep;24(9):2206-23. doi: 10.1093/annonc/mdt303. Epub 2013 Aug 4. PMID: 23917950; PMCID: PMC3755334.
- Goldmann O. and Medina E. *Metabolic pathways fueling the suppressive activity of myeloid derived suppressor cells*. (2024). *Front. Immunol.* 15:1461455. doi: 10.3389/fimmu.2024.1461455.
- Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, Campisi J, Collado M, Evangelou K, Ferbeyre G, Gil J, Hara E, Krizhanovsky V, Jurk D, Maier AB, Narita M, Niedernhofer L, Passos JF, Robbins PD, Schmitt CA, Sedivy J, Vougas K, von Zglinicki T, Zhou D, Serrano M, Demaria M. *Cellular Senescence: Defining a Path Forward*. *Cell.* (2019) Oct 31;179(4):813-827. doi: 10.1016/j.cell.2019.10.005. PMID: 31675495.
- Gradishar WJ, Moran MS, Abraham J, Abramson V, Aft R, Agnese D, Allison KH, Anderson B, Burstein HJ, ew H, Dang C, Elias AD, Giordano SH, Goetz MP, Goldstein LJ, Hurvitz SA, Jankowitz RC, Javid SH, rishnamurthy J, Leitch AM, Lyons J, Mortimer J, Patel SA, Pierce LJ, Rosenberger LH, Rugo HS, Schneider B, Smith ML, Soliman H, Stringer-Reasor EM, Telli ML, Wei M, Wisinski KB, Young JS, Yeung K, Dwyer MA, Kumar R. *NCCN Guidelines® Insights: Breast Cancer, Version 4. (2023)*. *J Natl Compr Canc Netw.* 2023 Jun;21(6):594-608. doi: 10.6004/jnccn.2023.0031. PMID: 37308117.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. *Immunity, inflammation, and cancer*. *Cell.* (2010) Mar 19;140(6):883-99. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025. PMID: 20303878; PMCID: PMC2866629.

- Han J, Lyu X, Wu M, Lin C, Zhou Y, Wang W. *T-cell exhaustion and senescence in cancer: Regulatory circuits and therapeutic state engineering*. *Cancer Lett.* 2026 Sep 19;660:218841. doi: 10.1016/j.canlet.2026.218841. Epub ahead of print. PMID: 42762964.
- Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell.* (2011);144(5):646-674.
- Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, Cardoso F. *Breast cancer*. *Nat Rev Dis Primers.* 2019 Sep 23;5(1):66. doi: 10.1038/s41572-019-0111 2. PMID: 31548545.
- He S, Sharpless NE. *Senescence in Health and Disease*. *Cell.* (2017) Jun 1;169(6):1000-1011. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.015. PMID: 28575665; PMCID: PMC5643029.
- <http://biologa.altervista.org/laboratorio-analisi/citometria-a-flusso>
- [https://www.gruppobios.it/wp-content/uploads/2017/05/LA-CITOMETRIA A-FLUSSO.pdf](https://www.gruppobios.it/wp-content/uploads/2017/05/LA-CITOMETRIA-A-FLUSSO.pdf)
- <https://www.labtestsonline.it/approfondimenti/citofluorimetria.html>
- Hu X, Li B, Li X, Zhao X, Wan L, Lin G, Yu M, Wang J, Jiang X, Feng W, Qin Z, Yin B, Li Z. *Transmembrane TNF- α promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2*. *J Immunol.* 2014 Feb 1;192(3):1320-31. doi: 10.4049/jimmunol.1203195. Epub 2013 Dec 30. PMID: 24379122.
- Koivula T, Lempiäinen S, Neuvonen J, Norha J, Hollmén M, Sundberg CJ, Rundqvist H, Minn H, Rinne P and Heinonen I (2024) *The effect of exercise and disease status on mobilization of anti-tumorigenic and pro-tumorigenic immune cells in women with breast cancer*. *Front. Immunol.* 15:1394420. doi: 10.3389/fimmu.2024.1394420
- Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, Jervis S, van Leeuwen FE, Milne RL, Andrieu N, Goldgar DE, Terry MB, Rookus MA, Easton DF, Antoniou AC; BRCA1 and BRCA2 Cohort Consortium; McGuffog L, Evans DG, Barrowdale D, Frost D, Adlard J, Ong KR, Izatt L, Tischkowitz M, Eeles R, Davidson R, Hodgson S, Ellis S, Nogues C, Lasset C, Stoppa-Lyonnet D, Fricker JP, Faivre L, Berthet P, Hoening MJ, van der Kolk LE, Kets CM, Adank MA, John EM, Chung WK, Andrulis IL, Southey M, Daly MB, Buys SS, Osorio A, Engel C, Kast K, Schmutzler RK, Caldes T, Jakubowska A, Simard J, Friedlander ML, McLachlan SA, Machackova E, Foretova

- L, Tan YY, Singer CF, Olah E, Gerdes AM, Arver B, Olsson H. *Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers*. JAMA. (2017) Jun 20;317(23):2402-2416. doi: 10.1001/jama.2017.7112. PMID: 28632866.
- Langhi Prata LGP, Tchkonina T, Kirkland JL. *Cell senescence, the senescence-associated secretory phenotype, and cancers*. PLoS Biol. (2023) Sep 21;21(9):e3002326. doi: 10.1371/journal.pbio.3002326. PMID: 37733806; PMCID: PMC10547493.
- Li X, Liu J, Xing Z, Tang J, Sun H, Zhang X, Lv S, Chen Z, Shi M, Chen M, Zuo S, Lyu X, He Y. *Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells link inflammation and damage response after trauma*. J Leukoc Biol. 2021 Dec;110(6):1143-1161. doi: 10.1002/JLB.3MA0821-029R. Epub 2021 Oct 12. PMID: 34636072.
- Liang H, Li H, Xie Z, Jin T, Chen Y, Lv Z, Tan X, Li J, Han G, He W, Qiu N, Jiang M, Zhou J, Xia H, Zhan Y, Cui L, Guo W, Huang J, Zhang X, Wu YL. *Quantitative multiplex immunofluorescence analysis identifies infiltrating PD1⁺ CD8⁺ and CD8⁺ T cells as predictive of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer*. Thorac Cancer. 2020 Oct;11(10):2941-2954. doi: 10.1111/1759-7714.13639. Epub 2020 Sep 7. PMID: 32894006; PMCID: PMC7529566.
- Liu Y, Sanoff HK, Cho H, Burd CE, Torrice C, Ibrahim JG, Thomas NE, Sharpless NE. *Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging*. Aging Cell. (2009) Aug;8(4):439-48. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00489.x. Epub 2009 May 22. PMID: 19485966; PMCID: PMC2752333.
- Liu, Q., Shi, X., Tayier, N. *et al*. *Tumor irradiation induced immunogenic response: the impact of DNA damage induction and misrepair*. Radiat Oncol **20**, 133 (2025).
- Lu J, Luo Y, Rao D, Wang T, Lei Z, Chen X, Zhang B, Li Y, Liu B, Xia L, Huang W. *Myeloid-derived suppressor cells in cancer: therapeutic targets to overcome tumor immune evasion*. Exp Hematol Oncol. (2024) Apr 12;13(1):39. doi: 10.1186/s40164-024-00505-7. PMID: 38609997; PMCID: PMC11010322.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. *et al*. *Cancer-related inflammation*. Nature **454**, 436–444 (2008).
- Martin-García D, Téllez T, Redondo M, García-Aranda M. *Calcium Homeostasis in the Development of Resistant Breast Tumors*. Cancers. (2023).

- Mehmeti-Ajradini M, Bergenfelz C, Larsson AM, Carlsson R, Riesbeck K, Ahl J, Janols H, Wullt M, Bredberg A, Källberg E, Björk Gunnarsdottir F, Rydberg Millrud C, Rydén L, Paul G, Loman N, Adolfsson J, Carneiro A, Jirstrom K, Killander F, Bexell D, Leandersson K. *Human G-MDSCs are neutrophils at distinct maturation stages promoting tumor growth in breast cancer*. Life Sci Alliance. 2020 Sep 21;3(11):e202000893. doi: 10.26508/lsa.202000893. PMID: 32958605; PMCID: PMC7536824.
- Merck. MILLIPLEX® Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A Magnetic Bead Panel: 96-Well Plate Assay. User Guide. 20422338 Rev. 09/25. Merck.
- Nuciforo P, Pascual T, Cortés J, Llombart-Cussac A, Fasani R, Paré L, Oliveira M, Galvan P, Martínez N, Bermejo B, Vidal M, Pernas S, López R, Muñoz M, Garau I, Manso L, Alarcón J, Martínez E, Rodrik-Outmezguine V, Brase JC, Villagrasa P, Prat A, Holgado E. *A predictive model of pathologic response based on tumor cellularity and tumor-infiltrating lymphocytes (CelTIL) in HER2-positive breast cancer treated with chemo-free dual HER2 blockade*. Ann Oncol. 2018 Jan 1;29(1):170-177. doi: 10.1093/annonc/mdx647. PMID: 29045543.
- Oh, K., Lee, OY., Shon, S.Y. *et al.* *A mutual activation loop between breast cancer cells and myeloid-derived suppressor cells facilitates spontaneous metastasis through IL-6 trans-signaling in a murine model*. Breast Cancer Res **15**, R79 (2013). <https://doi.org/10.1186/bcr3473>
- Paixão, E.M., Oliveira, A.d., Pizato, N. *et al.* *The effects of EPA and DHA enriched fish oil on nutritional and immunological markers of treatment naïve breast cancer patients: a randomized double-blind controlled trial*. Nutr J **16**, 71 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12937-017-0295-9>
- Pawelec G. *Immunosenescence and cancer*. Biogerontology. (2017) Aug;18(4):717-721. doi: 10.1007/s10522-017-9682-z. Epub 2017 Feb 20. PMID: 28220304.
- Pawelec G. *Is There a Positive Side to T Cell Exhaustion?* (2019) Front. Immunol. 10:111. doi: 10.3389/fimmu.2019.00111
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE,

- Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature. (2000) Aug 17;406(6797):747-52. doi: 10.1038/35021093. PMID: 10963602.
- Rodríguez IJ, Bernal-Estévez DA, Llano-León M, Bonilla CE, Parra-López CA. *Neoadjuvant chemotherapy modulates exhaustion of T cells in breast cancer patients*. PLoS One. 2023 Feb 10;18(2):e0280851. doi: 10.1371/journal.pone.0280851. PMID: 36763585; PMCID: PMC9916600.
- Roederer M., *Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats*, in *Cytometry*, vol. 45, n. 3, 1o novembre (2001), pp. 194-205.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2023. CA: *A Cancer Journal for Clinicians*. (2023);73(1):17-48. doi: 10.3322/caac.21763.
- Speigl L, Burow H, Bailur JK, Janssen N, Walter CB, Pawelec G, Shipp C. *CD14+ HLA-DR-/low MDSCs are elevated in the periphery of early-stage breast cancer patients and suppress autologous T cell proliferation*. Breast Cancer Res Treat. 2018 Apr;168(2):401-411. doi: 10.1007/s10549-017-4594-9. Epub 2017 Dec 11. PMID: 29230664.
- Sun X, Ocampo AA, Hanna A, Taylor BC, Marshall JL, Steele JA, Axelrod ML, Wescott EC, Opalenik SR, DeMichele A, Esserman LJ, Liu MC, Nanda R, Wolf DM, Brown Swigart L, Hirst GL, van 't Veer LJ, Xu Y, Balko JM. *Peripheral blood transcriptional profiling predicts tumor subtype and neoadjuvant chemoimmunotherapy outcomes in human breast cancer*. Sci Transl Med. 2026 Apr 22;18(846):eaec2358. doi: 10.1126/scitranslmed.aec2358. Epub 2026 Apr 22. PMID: 42018670; PMCID: PMC13195816.
- Veglia, F., Sanseviero, E. & Gabrilovich, D.I. *Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity*. Nat Rev Immunol **21**, 485–498 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00490-y>
- Vernieri C, Fucà G, Ligorio F, Huber V, Vingiani A, Iannelli F, Raimondi A, Rinchai D, Frigè G, Belfiore A, Lalli L, Chiodoni C, Cancila V, Zanardi F, Ajazi A, Cortellino S, Vallacchi V, Squarcina P, Cova A, Pesce S, Frati P, Mall R, Corsetto PA, Rizzo AM, Ferraris C, Folli S, Garassino MC, Capri G, Bianchi G, Colombo MP, Minucci S, Foiani M, Longo VD, Apolone G, Torri V, Pruneri G, Bedognetti D, Rivoltini L, de Braud F. *Fasting-Mimicking Diet Is Safe and Reshapes Metabolism and Antitumor Immunity in Patients with Cancer*.

- Cancer Discov. (2022) Jan;12(1):90-107. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-0030. Epub 2021 Nov 17. PMID: 34789537; PMCID: PMC9762338.
- Wang Y., Dong Q., Yuan M., Hu J., Lin P., Yan Y., Wang Y., Wang Y., *Effects of metabolism upon immunity: Targeting myeloid-derived suppressor cells for the treatment of breast cancer is a promising area of study*, International Immunopharmacology, Volume 147, (2025).
- Wang, B., Han, J., Elisseeff, J.H. *et al.* *The senescence-associated secretory phenotype and its physiological and pathological implications*. *Nat Rev Mol Cell Biol* **25**, 958–978 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00727-x>
- Wawruszak A, Halasa M, Okoń E, Kukula-Koch W, Stępulak A. *Valproic Acid and Breast Cancer: State of the Art*, (2021).
- Wesolowski R, Stiff A, Quiroga D, McQuinn C, Li Z, Nitta H, Savardekar H, Benner B, Ramaswamy B, Lustberg M, Layman RM, Macrae E, Kassem M, Williams N, Sardesai S, VanDeusen J, Stover D, Cherian M, Mace TA, Yu L, Duggan M, Carson WE 3rd. *Exploratory analysis of immune checkpoint receptor expression by circulating T cells and tumor specimens in patients receiving neo-adjuvant chemotherapy for operable breast cancer*. *BMC Cancer*. 2020 May 19;20(1):445. doi: 10.1186/s12885-020-06949-4. PMID: 32429929; PMCID: PMC7236344.
- Wherry, E., Kurachi, M. *Molecular and cellular insights into T cell exhaustion*. *Nat Rev Immunol* **15**, 486–499 (2015). <https://doi.org/10.1038/nri3862>
- World Health Organization. *WHO Classification of Tumours: Breast Tumours*. 5th ed. Lyon, France: IARC; (2019).
- Xia Liu *et al.*, *Reprogramming lipid metabolism prevents effector T cell senescence and enhances tumor immunotherapy*. *Sci. Transl. Med.* **13**, eaaz6314(2021).DOI:[10.1126/scitranslmed.aaz6314](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz6314)
- Xingzhe Ma, Enguang Bi, Yong Lu, Pan Su, Chunjian Huang, Lintao Liu, Qiang Wang, Maojie Yang, Matthew F. Kalady, Jianfei Qian, Aijun Zhang, Anisha A. Gupte, Dale J. Hamilton, Chengyun Zheng, Qing Yi, *Cholesterol Induces CD8+ T Cell Exhaustion in the Tumor Microenvironment*, Cell Metabolism, Volume 30, Issue 1, 2019
- Zhao X, Rong L, Zhao X, Li X, Liu X, Deng J, Wu H, Xu X, Erben U, Wu P, Syrbe U, Sieper J, Qin Z. *TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation*. *J Clin*

Invest. 2012 Nov;122(11):4094-104. doi: 10.1172/JCI64115. Epub 2012 Oct 15. PMID: 23064360; PMCID: PMC3484453.

Zhou Z, Zhang Y, Li Y, Jiang C, Wu Y, Shang L, Huang Y, Cheng S. *Metabolic syndrome is a risk factor for breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy: A case-control study*. Front Oncol. 2023 Jan 4;12:1080054. doi: 10.3389/fonc.2022.1080054. PMID: 36686748; PMCID: PMC9845900.