

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

**Analisi lipidomica e caratterizzazione dei linfociti T esausti e senescenti
circolanti: nuove prospettive nel carcinoma mammario metastatico ER+ HER2-
trattato con inibitori delle chinasi ciclina dipendenti 4/6 (CDK4/6)**

Relatore: Prof.ssa Valentina Audrito

Correlatore: Prof.ssa Alessandra Gennari

Candidata: Micaela Sormani

Matricola: - 20035499

Anno accademico 2023/2024

Indice

1. Tumore alla mammella	4
1.1 Incidenza e mortalità del tumore alla mammella in Italia	4
1.2 Patogenesi e formazione del tumore alla mammella	4
1.3 Eziologia e fattori di rischio	7
1.4 Sintomi	8
1.5 Diagnosi	9
1.6 Stadiazione	11
1.7 Grading	12
1.8 Classificazione del tumore alla mammella secondo la sede di origine	14
1.9 Caratterizzazione dei sottotipi molecolari del cancro della mammella	15
1.10 Tumore luminale di tipo metastatico	19
1.10.a Trattamenti e terapia del tumore luminale.....	23
1.10.b Il ruolo del microambiente tumorale nel carcinoma mammario (TME)	29
1.11 Il sistema immunitario e il tumore	31
1.11.a Sistema immunitario.....	31
1.11.b Legame tra sistema immunitario e cancro	32
1.11.c Senescenza delle cellule e il loro legame con le SASP.....	35
1.11.d Senescenza dei linfociti T	37
1.11.e Linfociti T esausti	40
1.12 Lipidomica	43
1.12.a Il potenziale impatto dei lipidi sul cancro	43
2. Scopo dell'elaborato	47
3. Materiali e metodi	49
3.1 Disegno dello studio e pazienti	49
3.2 Procedura di raccolta e trasporto dei campioni biologici	50
3.3 Staining dei linfociti T senescenti ed esausti	51
3.4 Citofluorimetria	55
3.5 Gating strategy linfociti T senescenti ed esausti	60

3.6 Plasma	63
3.7 Estrazione dei lipidi a partire da plasma e analisi lipidomica	64
3.8 Analisi statistiche.....	69
4. Risultati.....	70
4.1 Descrizione della popolazione in studio	70
4.2 Caratterizzazione dei linfociti T senescenti ed esausti circolanti nei pazienti con malattia stabile/risposta parziale (SD/PR) ed in progressione di malattia (PD) prima dell'inizio della terapia.	73
4.2.a Valutazione della frequenza delle sottopopolazioni nei due gruppi di pazienti: SD/PR vs PD ..	73
4.2.b Associazione tra la frequenza di linfociti T esausti CD4+CD28+PD1+ e la progressione libera da malattia (PFS).....	78
4.3 Valutazione dell'espressione dei marcatori specifici di sottopopolazione dei linfociti T nei due sottogruppi di pazienti in termini di risposta alla terapia (SD/PR vs PD).	79
4.3.a Associazione tra l'espressione di linfociti T CD8+ positivi a LAG3 e la progressione libera da malattia (PFS)	84
4.3.b Associazione tra l'espressione di linfociti T CD3+ positivi a KLRG1+ e la progressione libera da malattia (PFS)	85
4.4 Valutazione della frequenza di linfociti T senescenti e T esausti circolanti in base alla sede di metastasi	86
4.5 Valutazione della % di linfociti T senescenti e T esausti circolanti in base al marcatore di proliferazione Ki-67	91
4.6 Confronto dell'espressione di HER-2 nelle pazienti tramite l'analisi dei linfociti T senescenti ed esausti	96
4.7 Analisi del profilo lipidomico nel plasma dei pazienti con carcinoma mammario metastatico prima dell'inizio della terapia con CDK4/6i.	101
4.8 Correlazione tra il profilo lipidico e i linfociti T senescenti ed esausti nel sangue periferico	103
5. Discussione.....	105
6. Conclusione	110
7. Sitografia	111

1. Tumore alla mammella

1.1 Incidenza e mortalità del tumore alla mammella in Italia

Il tumore della mammella è il cancro più frequentemente diagnosticato nei soggetti di sesso femminile in Italia, con circa 55.900 casi nel 2023 con un'incidenza crescente fino ad un'età compresa tra i 50-55 anni, per poi rallentare e stabilizzarsi dopo la menopausa. Durante l'intero arco della vita, una donna su nove è a rischio di sviluppare una neoplasia della mammella, in particolare le stime più recenti indicano che in Italia sono circa 800.000 le donne che hanno ricevuto una diagnosi di tumore della mammella durante la loro vita. È stato stimato un aumento del circa 0,2% annuo di incidenza di nuove diagnosi ed una tendenza nella diminuzione della mortalità legata a questa patologia (-0,8%/anno), attribuibile alla maggiore diffusione dei programmi di diagnosi precoce e ai progressi terapeutici. ¹

1.2 Patogenesi e formazione del tumore alla mammella

Il tessuto mammario è composto da: (Fig.1)

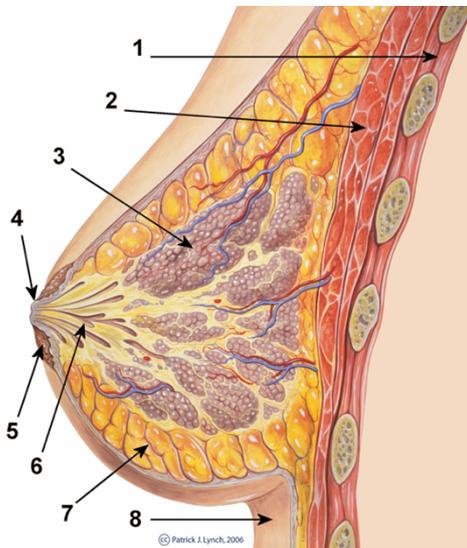


Figura 1 riporta una mammella vista in sezione. È possibile osservare secondo i punti: 1. Cassa toracica; 2. Muscoli pettorali; 3. Lobuli; 4. capezzolo; 5. Areola; 6. Dotti; 7. Tessuto adiposo; 8. Pelle
Adottato da Original author: Patrick J. Lynch. Reworked by Morgoth666 to add numbered legend arrows. - Patrick J. Lynch, medical illustrator, CC BY 3.0.
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2676813>.

- Una parte ghiandolare che è caratterizzata dalla presenza di 15-20 lobuli che hanno uno sbocco verso il capezzolo nel dotto galattoforo
- Una parte adiposa dove vi sono inserite e vi sono immerse le strutture ghiandolari

- Una parte fibrosa di sostegno che suddivide le diverse appendici ghiandolari

All'apice della mammella vi è la presenza del capezzolo.

Nelle cellule sane del tessuto della mammella si possono verificare mutazioni genetiche che compromettono prettamente il controllo della proliferazione cellulare, portando allo sviluppo e alla crescita di una massa anomala.

Il tumore alla mammella rappresenta il risultato di un complesso processo di cancerogenesi, multifattoriale e caratterizzato da una serie di eventi molecolari e cellulari interconnessi. Le ghiandole mammarie sono strutturate come un complesso sistema di tubuli epiteliali ramificati, immersi in uno stroma eterogeneo. Questo microambiente stromale subisce modifiche dinamiche nel corso del tempo, in termini di dimensioni, morfologia e funzione, riflettendo un'organizzazione architettonica complessa che è sostenuta da un *pool* diversificato di cellule staminali mammarie. Queste cellule staminali, dotate di una plasticità intrinseca, sono implicate nella regolazione della morfogenesi e dell'omeostasi della componente duttale.

Esistono teorie che ipotizzano che queste cellule staminali possano essere all'origine della tumorigenesi mammaria, attraverso la deregolazione di specifiche vie di segnalazione molecolare che controllano processi chiave come la proliferazione cellulare, la sopravvivenza e la migrazione. Tra queste vie di segnalazione, spiccano quelle mediate da Wnt/ β -catenina, ciclo-dipendenti chinasi (CDK), NOTCH, e PI3K/AKT/mTOR, tutte potenzialmente coinvolte nelle fasi iniziali della trasformazione neoplastica nel carcinoma mammario (Fig. 2).²

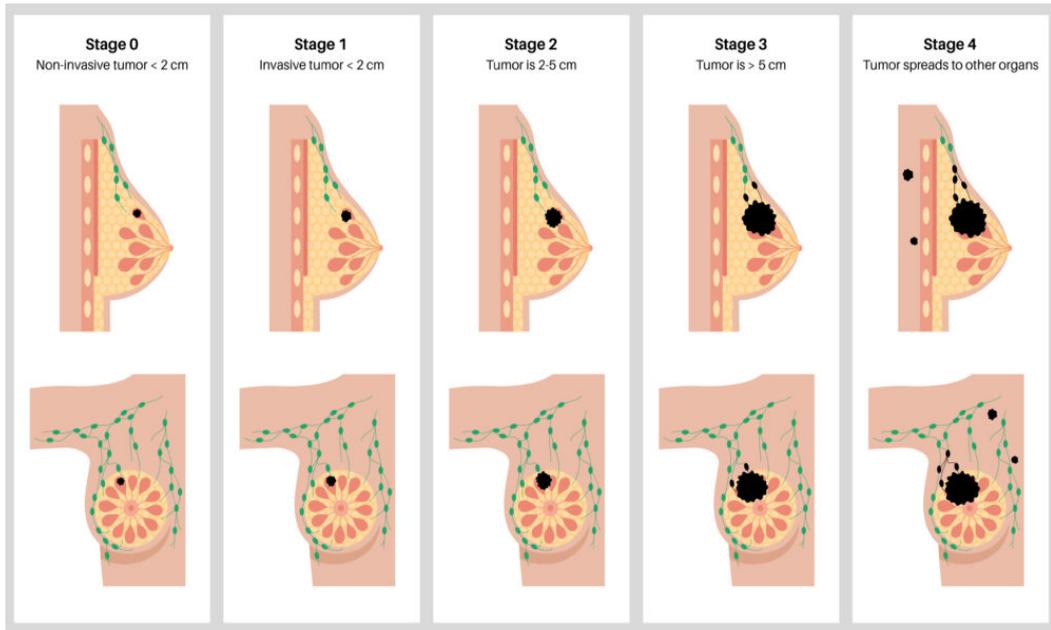


Figura 2 Stadi del carcinoma mammario associati al suo tipico stato di sviluppo. A partire dallo stadio III, si identifica un chiaro coinvolgimento dei linfonodi, mentre lo stadio IV è rappresentato dalla metastasi (punteggio M1 nella classificazione TNM) <https://www.micuro.it/enciclopedia/malattie/tumore-seno-istituto-candiolo>

1.3 Eziologia e fattori di rischio

La patogenesi del tumore al seno è un processo complesso e multifattoriale che coinvolge una serie di fattori genetici, comportamentali e ambientali che sono sotto riportati:

- Età e sesso, perché l'incidenza della patologia è più elevata nelle donne di età compresa tra 65 e 74 anni. L'età mediana alla diagnosi è di 63 anni.
- Razza ed etnia, poiché la diagnosi nelle donne di colore è stimata intorno ai 60 anni mentre nelle donne bianche è circa di 63 anni.
- Anamnesi familiare o personale, poiché la presenza di un parente di primo grado o un familiare con una storia pregressa di carcinoma della mammella aumenta il rischio di sviluppare una massa.
- Mutazioni dei geni nel carcinoma mammario circa il 5-10% delle donne presenta una mutazione in uno dei due geni BRCA noti, BRCA1 o BRCA2. Il rischio di sviluppare un tumore al seno entro gli 80 anni è approssimativamente del 72% per chi ha una mutazione del gene BRCA1 e del 69% per chi ha una mutazione del gene BRCA2. Anche gli uomini con mutazioni nel gene BRCA2 presentano un rischio dell'1-2% di sviluppare un cancro al seno durante la loro vita. Le mutazioni BRCA sono più comuni tra le persone di origine ebraica Ashkenazita. Le donne con mutazioni BRCA1 o BRCA2 necessitano di una sorveglianza più attenta o di misure preventive, come lo screening con mammografia e risonanza magnetica, l'assunzione di tamoxifene o la mastectomia profilattica.
- Terapia ormonale, in quanto le fluttuazioni degli ormoni estrogeni e progesterone possono influenzare il rischio di cancro al seno.
- Radioterapia, perché l'esposizione a radiazioni ionizzanti può divenire un rischio
- Dieta e obesità concatenati a uno stile di vita possono influire nella formazione del cancro anche se sono ancora incerti i fattori correlati. ³

1.4 Sintomi

Le forme iniziali di tumore alla mammella non comportano la presenza di dolore alla paziente ma, con il passare del tempo, è possibile acquisire alcuni segni e sintomi che sono caratteristici della patologia ovvero:

- Sviluppo di un nodulo mammario o rigonfiamento di uno nodulo ascellare
- Cambiamenti nelle dimensioni o nella forma della mammella
- Retrazione cutanea o di un capezzolo
- Aumento della consistenza del tessuto mammario
- Eruzione cutanea su un capezzolo e secrezioni da esso
- Dolore o fastidio persistente alla mammella
- Ispessimento e arrossamento cutaneo

La presenza di noduli palpabili o addirittura visibili sono dei segni di una forma di tumore già avanzata.

In aggiunta a questi segni possono subentrare anche quelli caratteristici correlati alla presenza di metastasi come, per esempio, la comparsa di un nodulo o di gonfiore nel cavo ascellare, nell'area dello sterno o nell'area della clavicola.

Il dolore osseo localizzato o la tendenza di un osso a fratturarsi potrebbero suggerire la presenza di metastasi ossee, mentre quelle polmonari possono causare sintomi come infezioni respiratorie, tosse persistente e mancanza di fiato. ⁴

1.5 Diagnosi

La procedura per la diagnosi del cancro alla mammella si avvale di un esame clinico, una diagnostica per immagini e, infine, una biopsia. ³

Esame clinico: si articola in una visita senologica per definire familiarità, l'età del primo ciclo mestruale/menopausa; le gravidanze passate o in corso; le terapie ormonali assunte; le abitudini alimentari. ⁵

Mammografia: consente di identificare il tumore negli stadi iniziali del suo sviluppo, permettendo di individuare una massa inferiore a 1 centimetro. Grazie alla sua elevata sensibilità, la mammografia viene utilizzata anche per rilevare formazioni potenzialmente tumorali nella mammella.

L'esame viene eseguito mediante uno specifico strumento detto mammografo, che proietta un fascio di raggi X direttamente su ciascuna mammella, consentendo un confronto sia a livello morfologico che strutturale tra le due mammelle.

Questo esame non presenta particolari controindicazioni e non ci sono dei limiti di età per potersi sottoporre a questa metodica. È infatti consigliato anche per le donne sopra i 70 anni, previa identificazione del loro stato di salute.

Le donne sotto i 40-45 anni di età sono generalmente caratterizzate da un'elevata densità della ghiandola mammaria, che può rendere difficoltosa l'interpretazione della mammografia. Pertanto, nelle pazienti più giovani, si predilige svolgere un'ecografia per facilitare la lettura e la completa analisi del referto. ⁵

Le innovazioni nel campo scientifico hanno portato allo sviluppo di una nuova metodica che viene identificata come mammografia con tomosintesi, che permette di collegare i principi della mammografia tradizionale con quelli della tomografia. È una metodica che consente di ottenere immagini della mammella nelle tre dimensioni per poter effettuare uno studio più immediato e approfondito. Questa permette di ricostruire un seno in modo stratificato, fornendo un'analisi con un'elevata accuratezza diagnostica. La metodica in questione delinea un'immagine definita del nodulo e della sua sede, di eventuali distorsioni e di lesioni anche molto piccole e quindi difficilmente visualizzabili con la mammografia tradizionale.

Questo esame apporta maggiori benefici nello studio di mammelle dense, ricche di tessuto ghiandolare all'interno. ⁶

Ecografia: è un esame non invasivo, semplice e sicuro che utilizza una sonda ad ultrasuoni che emette a bassa frequenza ma ad alta intensità. Con questa modalità è possibile vedere eventuali formazioni all'interno del seno e discernere quelle a contenuto solido o liquido.

Questa metodica viene preferita in presenza di un seno giovane con noduli, caratterizzato da una densità ghiandolare che non permette l'analisi mediante la mammografia.

L'ecografia mammaria e la mammografia sono due esami complementari perché permettono di ottenere un quadro dettagliato dell'organo in questione.^{5, 7}

Risonanza magnetica: viene utilizzata in pazienti con una storia familiare di neoplasie mammarie, mutazioni dei geni BRCA, protesi mammarie o neoplasie lobulari.

Procedura complementare alle metodiche diagnostiche tradizionali, consentendo l'identificazione accurata di noduli di piccole dimensioni che possono sfuggire ad altre metodiche. Quest'analisi è anche impiegata per valutare la risposta della paziente al trattamento in corso e per pianificare le fasi successive della terapia.^{5, 8}

Biopsia: permette di ottenere delle informazioni sulla tipologia di cancro alla mammella.

Esistono due diverse tipologie di metodiche:

- Biopsia con ago spesso, dove si utilizza un ago cavo con una punta speciale con il compito di prelevare un tessuto mammario
- Biopsia aperta, dove i medici svolgono un piccolo taglio sulla zona di interesse e prelevano una parte o tutto il nodulo di interesse.

Spesso viene utilizzata la biopsia mammaria ecoguidata, ovvero una biopsia che è guidata mediante l'utilizzo di un sonografo.

Si distinguono diverse tipologie di biopsia ecoguidata in base alle dimensioni dell'ago usato e per le indicazioni al loro impiego in:

- Punzione all'ago fine (PAF) che permette di aspirare le cellule all'interno di un ago montato su una siringa per la verifica citologica. Questa metodica viene usata principalmente per svuotare cisti e per verificare la presenza di metastasi nei linfonodi ascellari, infraclavari o della catena mammaria interna.
- Ago biopsia o *Tru Cut* che permette di prelevare il tessuto per l'esame istologico. Questo esame consente il prelievo di una maggior quantità di tessuto al fine di definire in modo più specifico le caratteristiche delle neoplasie maligne quali:

l'invasione e le caratteristiche biologiche di un nodulo. Con l'ago biopsia si può differenziare un nodulo benigno da un nodulo maligno.

- Biopsia mammaria vacuum assistita, utilizza degli aghi con dei grandi diametri che permettono di asportare parzialmente o in maniera totale una parte di tessuto. Tale metodica utilizza un ago tranciante collegato ad un'aspirazione vacuum per ottenere frustoli di ghiandola mammaria.⁹

1.6 Stadiazione

La stadiazione del tumore alla mammella viene effettuata utilizzando il sistema TNM (*Tumor-Nodes-Metastasis*), che permette di standardizzare le caratteristiche di una patologia cancerosa.

Nello specifico, la classificazione TMN si avvale dei seguenti criteri:

- T (tumore): descrive la grandezza e l'estensione del tumore solido. Le categorie variano da T0, dove non è rilevato nessun tumore, a T4, dove è presente un cancro di grandi dimensioni che si estende anche alle strutture circostanti.
- N (linfonodi): descrive il coinvolgimento o meno dei linfonodi
- M (metastasi): descrive la presenza o l'assenza di metastasi lontane (non regionali) dalla sede del tumore primario.

Una volta che si è identificata la tipologia del tumore, esso può essere raggruppato secondo una classificazione generale che utilizza numeri romani (I-IV), dove un numero maggiore rispecchia una gravità crescente della malattia. Questo sistema di stadiazione è fondamentale per la pianificazione del trattamento e per la valutazione della prognosi nei pazienti affetti da cancro alla mammella.

In particolare, la suddivisione avviene mediante gli stadi riportati nella seguente tabella (Tab.1).^{3, 4}

Tabella 1. Stadiazione del tumore alla mammella secondo le caratteristiche e tipologie del tumore. Fonte: Fondazione Veronesi.

Stadio 0	- Carcinoma in situ. Può essere sia duttale che lobulare
Stadio I	- Tumore in fase iniziale: misura meno di 2 centimetri ed ha superato le pareti dei dotti galattofori o dei lobuli di origine - Non si è diffuso ai linfonodi
Stadio II	- Tumori in stadio più avanzato ma che rispondono bene alle terapie - Tumore di medie dimensioni (da 2 centimetri a oltre 5 centimetri) che ha raggiunto i linfonodi; tumore più piccolo (max. 5 centimetri) che ha raggiunto i linfonodi
Stadio III	- Tumore localmente avanzato - Estensione ai linfonodi e nelle aree vicino al seno
Stadio IV	- Tumore con metastasi diffuse

1.7 Grading

Il grado, o *grading*, rappresenta il livello di aggressività del tumore ed è basato sulla differenziazione cellulare della neoplasia, valutata attraverso il grado istologico.

Questo parametro viene generalmente indicato con la lettera G, accompagnata da un numero che va da 1 a 4 in base all'aggressività del cancro; un numero più elevato corrisponde a una malignità maggiore.

Nel contesto del cancro, le cellule sane subiscono modifiche che conferiscono loro un aspetto più o meno anomalo, influenzando la prognosi, le caratteristiche di crescita e l'aggressività. Se le cellule tumorali non differiscono significativamente dalle cellule normali, il tumore è considerato ben differenziato. In caso contrario, se le cellule tumorali appaiono molto anomale, esse sono considerate non differenziate o scarsamente differenziate, comportando una prognosi più sfavorevole per la paziente. I tumori ben differenziati tendono a crescere e diffondersi più lentamente rispetto a quelli non differenziati o scarsamente differenziati, implicando una gestione clinica diversa e un'aspettativa di trattamento più favorevole.

Il sistema di *grading* istologico è classificato secondo lo studio di tre parametri:

- Percentuale di formazione di strutture tubulari
- Numero di mitosi
- Pleomorfismo nucleare.

Ad ognuno di questi tre parametri si assegna un punteggio che varia da 1 a 3. La somma dei tre *score* determina un valore globale in base al quale si definisce il *grading* o grado istologico:

- Il grado 1 (G1) è individuato da uno *score* da 3 a 5. Questa classe è caratterizzata da un cancro ben differenziato. Pertanto, si ha la presenza di una neoplasia in cui le cellule, identificabili mediante esame al microscopio, mostrano lievi variazioni rispetto alle cellule normali del medesimo tessuto.
- Il grado 2 (G2) è individuato da uno *score* da 6 a 7. Questa classe è associata ad un carcinoma moderatamente differenziato.
- Il grado 3 (G3) è individuato da uno *score* da 8 a 9. Questa classe è caratterizzata da un cancro con una scarsa differenziazione. Si osservano cellule tumorali con aspetto altamente anomalo rispetto a quelle presenti fisiologicamente nello stesso tessuto.
- Il grado 4 (G4) è individuato da uno *score* maggiore di 9. Questa classe è associata ad un carcinoma in cui le cellule sono completamente indifferenziate, in quanto hanno completamente perso le caratteristiche del tessuto d'origine. Questa condizione è anche definita come anaplasia. ¹⁰

1.8 Classificazione del tumore alla mammella secondo la sede di origine

In base alla sede di origine del tumore alla mammella, esso può essere diviso in due principali tipologie: duttale e lobulare.

Il carcinoma mammario duttale ha origine all'interno dei dotti mammari, che costituiscono la via per il trasporto del latte verso il capezzolo durante l'allattamento. Questo tipo di tumore è spesso associato alla presenza di una massa o di un nodulo che possono essere rilevabili durante l'autopalpazione del seno o mediante esami di *imaging* come la mammografia.

Il carcinoma duttale può essere classificato come:

- Carcinoma duttale in situ (CDIS), se le cellule tumorali sono confinate nei dotti.
- Carcinoma duttale Infiltrante (CDI), se le cellule tumorali hanno invaso il tessuto circostante.

Il carcinoma mammario lobulare, invece, origina nei lobuli, ovvero le ghiandole produttrici di latte nel seno. È caratterizzato dalla presenza di una massa solida che può essere rilevata al tatto. La classificazione del carcinoma lobulare è divisa in:

- Carcinoma lobulare in situ (CLIS), dove le cellule tumorali sono confinate nei lobuli
- Carcinoma lobulare infiltrante (CLI), dove le cellule tumorali si diffondono attraverso il tessuto circostante ³

1.9 Caratterizzazione dei sottotipi molecolari del cancro della mammella

Tutte le cellule, incluse quelle tumorali, presentano sulla loro membrana plasmatica una serie di recettori molecolari. Questi recettori, caratterizzati da una specifica conformazione strutturale, regolano selettivamente l'interazione e l'ingresso di specifici ligandi, influenzando conseguentemente i processi biochimici e fisiologici intracellulari. La presenza di determinati recettori sulle cellule tumorali maligne della mammella può incidere significativamente sulla cinetica di espansione del tumore e sulla risposta ai trattamenti terapeutici.

È possibile caratterizzare i sottotipi di tumore alla mammella secondo l'espressione di biomarcatori presenti sulla superficie delle cellule neoplastiche. Tale tipizzazione consente di fornire indicazioni sulla prognosi e sui trattamenti più appropriati per la paziente.

Le discriminanti di questa classificazione sono:

- Recettore degli estrogeni (ER)
- Recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano (HER2)
- Ki-67
- Recettore dei progesteroni (Pgr)

I tumori al seno sono suddivisi in quattro tipologie di sottotipi molecolari che variano secondo lo stato del recettore ormonale e all'espressione del gene HER2.

Nella tabella (Tab.2) seguente sono riportati i principali sottotipi: ⁴

Tabella 2 con i sottotipi genetici del tumore alla mammella e le loro caratteristiche

Sottotipo genetico	Immunoistochimica
Luminale A	ER+ e/o PgR+, HER2-, Ki67 <20%
Luminale B/ HER2+	ER+ e/o PgR+, HER2+ (score 3+), Ki67 >20%
Luminale B/ HER2-	ER+ e/o PgR+, HER2-, Ki67 >20%
Basal-like	ER-, PgR-, HER2-
HER2-like	ER-, PgR-, HER2+

Recettore degli estrogeni (ER)

La presenza o l'assenza dei recettori degli estrogeni, noti anche come ER, consente di distinguere tra diverse tipologie di tumore. L'ER è una proteina situata sulla superficie delle cellule del corpo umano e gioca un ruolo fondamentale nei processi fisiologici di crescita, differenziazione e proliferazione cellulare. Questo recettore ormonale nucleare viene attivato tramite il legame con l'ormone estrogeno a livello fisiologico ed è coinvolto nei processi di crescita, differenziazione e proliferazione della componente cellulare.

Esistono due tipi di recettori per gli estrogeni che sono ER α (alfa) e ER β (beta).

Una volta attivato il *pathway*, in seguito al legame ligando-recettore, vi è una regolazione dell'espressione di geni che sono coinvolti in diverse funzioni biologiche come:

- Sviluppo del sistema riproduttivo e sessuale
- Densità ossea con regolazione del metabolismo delle ossa e il conseguente mantenimento della densità ossea
- Mantenimento della salute cardiovascolare mediante l'influenza sui vasi sanguigni e sulla funzionalità cardiaca
- Protezione delle funzioni neurali
- Regolazione dell'umore

La via del recettore degli estrogeni (ER) comprende sia strade canoniche che non canoniche. Nella via canonica gli estrogeni citoplasmatici si legano direttamente al recettore complementare e innescano la segnalazione. Nella via non canonica, gli estrogeni extracellulari si legano ai recettori della membrana plasmatica, attivano la via di segnalazione della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) o Ras.

In alternativa, gli estrogeni possono penetrare la membrana cellulare e successivamente legarsi con il monomero del recettore degli estrogeni, il quale subisce dimerizzazione e traslocazione nel nucleo per attivare la segnalazione.

Le cellule della mammella, così come altre cellule dell'organismo umano, sulla loro superficie sono dotate di recettori per gli estrogeni. Nel contesto del cancro alla mammella, la presenza o l'assenza del recettore degli estrogeni ER nelle cellule tumorali è una caratteristica importante per discriminare i diversi tipi di tumori mammari e che influenza sia il trattamento che la prognosi del paziente.

L'identificazione di questo recettore viene svolta mediante analisi sulla biopsia del tessuto e se il tumore risulta:

- ER-positivo (ER+), risponde alla stimolazione degli estrogeni, favorendo la crescita della massa tumorale attraverso la rapida proliferazione delle cellule neoplastiche. Il trattamento per tumori ER+ coinvolge terapie ormonali mirate a bloccare l'azione degli estrogeni.
- ER-negativo (ER-), è caratterizzato da cellule tumorali che non esprimono il recettore per gli estrogeni e quindi non rispondono alle loro stimolazioni. Il trattamento per tumori ER- comprende una chemioterapia o una radioterapia, poiché le terapie ormonali risultano inefficaci. ^{11,12}

HER2

Il recettore HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) è una proteina espressa sulla superficie delle cellule del corpo umano ed è coinvolto nella regolazione fisiologica della crescita e della divisione cellulare. Tuttavia, nelle cellule tumorali del cancro alla mammella, il gene HER2 può essere sovra espresso o amplificato, portando a un eccesso di copie del gene HER2 e ad una presenza in quantità eccessive del recettore.

È possibile distinguere tra tumori HER2 positivi (HER2+) o negativi (HER2-), dove i primi sono tendenzialmente più aggressivi in quanto sovraesprimono la proteina HER2+, oncogene funzione pro-cancerogenica, che promuove la crescita tumorale.

La presenza di HER2 permette l'utilizzo di terapie mirate che bloccano l'attività del recettore o inducono una risposta immunitaria contro le cellule HER2+, con conseguente rallentamento o arresto della crescita del tumore.

La determinazione dello stato di HER2 nei tumori alla mammella viene eseguita tramite *test* di laboratorio su campioni di tessuto tumorale prelevati durante una biopsia. ¹³

Ki-67

Il Ki-67 è un marcatore proteico utilizzato come indicatore della proliferazione cellulare. La sua funzione è particolarmente rilevante nell'ambito oncologico in quanto da un'idea del tasso di crescita delle cellule tumorali; infatti, una maggiore espressione della proteina è associata ad una maggior attività proliferativa delle cellule.

Il Ki-67 è una proteina presente nelle cellule durante la fase di divisione attiva (fase M) e le fasi G1, S e G2 del ciclo cellulare, mentre è assente nelle fasi di quiescenza (fase G0). Viene frequentemente utilizzato nella valutazione del tumore della mammella. I valori di Ki-67 indicano la percentuale di cellule tumorali in fase di proliferazione attiva e sono utili per valutare l'aggressività del tumore. Il valore di Ki-67 viene determinato mediante l'analisi immunohistochimica del tessuto tumorale e può essere:

- Basso ($\leq 14\%$), i tumori tendono ad essere meno aggressivi e hanno generalmente una prognosi migliore
- Intermedio ($15\% < x \leq 20\%$) indica una proliferazione cellulare moderata. Tumori con valori di Ki-67 in questo intervallo possono avere una prognosi variabile, a seconda di altri fattori come il tipo di tumore, il grado e lo stadio.
- Alto ($> 20\%$) generalmente sono considerati i tumori più aggressivi. Un alto valore di Ki-67 è associato a una maggiore velocità di crescita e a un rischio maggiore di metastasi e recidiva.

Questi valori aiutano a classificare il tumore e a decidere il piano di trattamento. ¹⁴

Recettore dei progesteroni (PGR)

Il recettore PGR è una proteina che è situata sulla superficie delle cellule dell'organismo umano e svolge un ruolo cruciale nella regolazione della risposta cellulare agli ormoni progestinici, come il progesterone. Nel campo oncologico e in particolare nel tumore mammario, la presenza o assenza di questo recettore è determinante per la prognosi e il trattamento delle pazienti.

Le cellule tumorali che esprimono il recettore dei progesteroni, dette *PGR-positive* (PGR+), sono sensibili agli effetti dell'ormone e sono inclini a rispondere con successo alla terapia ormonale, la quale mira a bloccare l'azione degli estrogeni e del progesterone per rallentare la crescita del tumore.

Al contrario, i tumori *PGR-negative* (PGR-) non esprimono il recettore per l'ormone e sono quindi meno sensibili alla terapia ormonale; in questi casi, si preferisce generalmente ricorrere a trattamenti come la chemioterapia o la radioterapia.

La determinazione dello stato del PGR viene effettuata tramite immunistochemica, nei campioni di tessuto tumorale. ¹⁵

1.10 Tumore luminale di tipo metastatico

Il tumore luminale rappresenta circa il 20-30% dei nuovi casi di tumore al seno che vengono diagnosticati ogni anno. Questa patologia risulta essere generalmente trattabile e solo in rari casi è curabile; essa comporta una sopravvivenza media di circa 2-3 anni e una sopravvivenza a 5 anni del 25%.

Solo il 5-10% dei tumori della mammella si presenta metastatico all'esordio. Nella restante percentuale dei casi, la diagnosi viene effettuata in pazienti precedentemente sottoposte a chirurgia e trattate in *setting* neoadiuvante o adiuvante per una neoplasia mammaria in stadio iniziale. Il rischio di una recidiva è variabile in base a diversi fattori, tra cui i precedenti trattamenti, le caratteristiche del paziente, la biologia e le caratteristiche istologiche del tumore primitivo.

Si stima che fino al 30% delle donne operate per un tumore della mammella diagnosticato in fase precoce possa, negli anni, sviluppare una recidiva di malattia.

Tale recidiva può essere:

- Locale, se si verifica nella mammella già operata o in quella contro-laterale;
- Locoregionale, se interessa i linfonodi o la cute vicino al tumore operato;
- A distanza, se coinvolge organi o sedi lontane dal tumore originario, come ossa, polmoni e fegato.

La biologia del tumore sembra influenzare il *pattern*, il *timing* di recidiva e la prognosi. I tumori con espressione dei recettori ormonali tendono a sviluppare metastasi ossee e presentano un rischio di recidiva minore ma prolungato nel tempo e sono associati ad una prognosi più favorevole. Al contrario i tumori con iperespressione di HER2 recidivano più precocemente, solitamente con coinvolgimento multiorgano, e hanno un marcato tropismo per il sistema nervoso centrale.

Esistono due sottotipi di tumore luminale, differenziati dalla velocità di replicazione delle cellule neoplastiche: *Luminal A*, caratterizzato da una bassa velocità di replicazione; *Luminal B*, caratterizzato da una replicazione cellulare più rapida e quindi da una maggior aggressività.

Le cellule tumorali metastatizzanti mantengono le caratteristiche biologiche del tumore primario e pertanto vengono trattate conformemente alle terapie stabilite per il tumore

di origine. Tuttavia, nel corso del tempo e dei trattamenti, le caratteristiche biologiche delle cellule metastatiche possono mutare. Non è raro osservare che un tumore inizialmente sensibile agli ormoni, ossia positivo per i recettori ormonali, perda la sensibilità alla terapia ormonale assumendo un fenotipo "triplo negativo".

La prognosi del tumore alla mammella metastatico è migliorata nel corso degli anni grazie ai progressi nella comprensione della malattia e nella ricerca di nuovi trattamenti. ^{1,5,16}

L'attività di metastatizzazione è regolata da modificazioni nei meccanismi molecolari e dalla presenza di mutazioni genetiche che facilitano il distacco e la diffusione del tumore. Una volta raggiunto il sito, le cellule tumorali "primarie" interagendo con il microambiente e le cellule del tessuto secondario, danno origine alla metastasi. Le cellule neoplastiche si muovono seguendo specifici meccanismi di dispersione:

- Disseminazione linfatica, le cellule tumorali possono infiltrarsi nei vasi linfatici vicini al tumore primario e raggiungere i linfonodi regionali, come i linfonodi ascellari che rappresentando uno dei primi siti di metastasi nel cancro mammario;
- Disseminazione locale, le cellule cancerogene possono diffondersi direttamente nei tessuti circostanti, come la parete toracica o la cute, attraverso la crescita invasiva della massa.
- Disseminazione ematica, le cellule neoplastiche possono entrare nella circolazione sanguigna attraverso i vasi presenti nel tumore primario e attraverso il flusso sanguigno raggiungono organi distanti, come polmoni, fegato, ossa e cervello (Fig.3).

In particolare, nel:

- 20-60% dei casi, si osservano metastasi ossee;
- 5-15% dei casi, nel fegato;
- 5-15% dei casi nel polmone e pleura;
- 5-10% dei casi nel sistema nervoso centrale;
- 20-40% dei casi a livello linfonodale e loco-regionale.

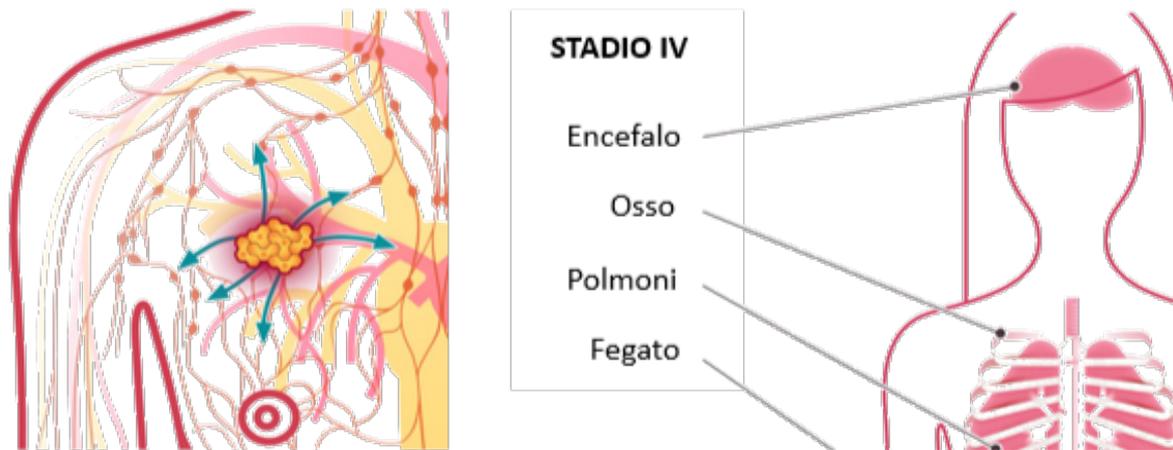


Figura 3: Metastasi del cancro alla mammella e gli organi e tessuti più colpiti. L'immagine illustra le sedi più comuni di sviluppo di metastasi correlate al tumore alla mammella; esse sono: encefalo, osso, polmoni e fegato. Fonte: <http://media.aiom.it/userfiles/files/doc/op-paz-fond/2018/Carcinoma.pdf>

Nel caso delle metastasi ossee, vengono generalmente interessati i segmenti scheletrici multipli, in particolare la colonna vertebrale, dove si manifestano come lesioni osteolitiche miste. Il sintomo che ne consente l'immediata identificazione è il dolore acuto, che può presentarsi come sordo e persistente o acuirsi in particolari momenti del giorno o della notte.

Esistono diverse tipologie di metastasi ossee, ciascuna associata a caratteristiche specifiche:

- Litiche, caratterizzate da un rapido indebolimento della struttura ossea
- Osteoaddensanti, la costruzione di una nuova parte dell'osso è più veloce dello smantellamento, portando alla formazione di un tessuto neoplastico duro
- Miste, presentano entrambe le tipologie

La compromissione dell'integrità ossea è spesso accompagnata da fratture patologiche, che non sono causate da traumi evidenti o sollecitazioni meccaniche significative.

Una criticità correlata alla malattia metastatica è l'ipercalcemia che non è tanto legata all'estensione dello sviluppo tumorale nell'apparato scheletrico, quanto a un meccanismo paraneoplastico di secrezione citochinica. Questo parametro deve essere sempre considerato quando si riscontrano dei disturbi a livello di coscienza, affaticamento o aritmie cardiache.

Nel caso di coinvolgimento epatico, non si verificano sintomatologie specifiche, ma si registra un complesso di eventi che tende a peggiorare con la compromissione dell'organo; questi includono nausea, perdita dell'appetito e dolore, fino all'insufficienza epatica. Le metastasi epatiche possono evolvere rapidamente, specialmente quando coinvolgono in modo diffuso gli spazi portali o le vene epatiche. Le metastasi polmonari sono comuni e si manifestano con sintomi quali difficoltà respiratoria, versamento pleurico, disfonia, dolore toracico e tosse persistente, talvolta accompagnata da emottisi, fino a casi di insufficienza respiratoria grave associata a linfangite carcinomatosa polmonare.

Le metastasi cerebrali, particolarmente frequenti nei tumori HER2+, possono interessare prevalentemente gli emisferi cerebrali (nell'80% dei casi), ma anche il cervelletto, il tronco encefalico, i gangli della base e le meningi, manifestando sintomi diversi a seconda della regione coinvolta. Meno frequentemente, la metastatizzazione può colpire le leptomeningi, causando meningite neoplastica, con un decorso generalmente rapido e fatale. ^{17,18}

1.10.a Trattamenti e terapia del tumore luminale

Per garantire l'utilizzo di una terapia idonea alle pazienti, è utile considerare l'evoluzione della malattia mediante una suddivisione in gruppi. La classificazione è articolata in tre categorie principali:

- Malattia indolente, con un basso rischio di mortalità a breve termine. Comprende pazienti con un lungo intervallo libero da malattia (>24 mesi dal termine della terapia adiuvante), un numero limitato di lesioni metastatiche (interessamento epatico inferiore al 30%; metastasi polmonari limitate e di piccolo volume) e un interessamento osseo e/o dei tessuti molli
- Malattia aggressiva, associata a un rischio intermedio-alto di morte a breve termine. È definita dalla presenza di crisi viscerale, un elevato numero di metastasi in organi multipli, compromissione funzionale d'organo e un breve intervallo libero di malattia (comparsa di metastasi durante la terapia adiuvante o entro i 12 mesi dal termine).
- Malattia oligometastatica, caratterizzata dalla presenza di una lesione singola o di un limitato numero di lesioni metastatiche di dimensioni ridotte, solitamente fino a cinque e non necessariamente nello stesso organo.^{19,20}

I trattamenti per il tumore alla mammella metastatico comprendono terapie che sono sia locali che sistemiche. Essi sono utilizzati al fine di adempiere a tre obiettivi principali:

- Ritardare la progressione della patologia poiché non esiste una cura in grado di guarire in via definitiva la malattia in fase avanzata. Sono stati studiati alcuni trattamenti che consentono di tenere sotto controllo il tumore andando ad arrestare o rallentare la crescita delle lesioni già esistenti o evitando la comparsa di nuove lesioni. Lo scopo è la cronicizzazione della malattia.
- Aumentare la sopravvivenza delle pazienti
- Migliorare la qualità di vita delle donne affette da carcinoma mammario tramite il controllo della malattia e riduzione dei sintomi. Questo approccio si basa sulla diminuzione delle dimensioni delle lesioni tumorali; i trattamenti possono alleviare o eliminare i sintomi legati alla presenza della malattia, quali dolore, difficoltà respiratoria, nausea e vomito, migliorando così la qualità della vita delle pazienti. Esistono inoltre terapie specifiche per la riduzione degli effetti collaterali.

Sono disponibili diverse opzioni terapeutiche che agiscono a livello sistemico, cioè su tutto l'organismo; esse possono variare in base a:

- Lo stato dei recettori ormonali
- Lo stato di HER2
- La necessità o meno di avere una risposta rapida alla terapia
- Le terapie ricevute in precedenza
- Lo stato generale del paziente

I principali trattamenti sistemici includono:

- Terapia ormonale
- Chemioterapia
- Terapia a bersaglio molecolare
- Immunoterapia ²¹

Terapia ormonale

Gli ormoni sono biomolecole sintetizzate dalle ghiandole del sistema endocrino che agiscono come messaggeri chimici, regolando l'attività di specifici organi e influenzando anche aree remote attraverso il sistema circolatorio.

La terapia ormonale, conosciuta anche come terapia endocrina, costituisce il trattamento primario per le pazienti affette da carcinoma mammario ER+/HER2-. Questa terapia mira a sopprimere la produzione e l'azione degli ormoni che favoriscono la proliferazione delle cellule tumorali.

Il trattamento ormonale viene impiegato sia (I) in *setting* neoadiuvante, prima dell'intervento chirurgico, con l'obiettivo di ridurre le dimensioni della massa tumorale, sia (II) come terapia adiuvante, dopo chirurgia e/o radioterapia, per ridurre il rischio di recidiva del tumore e prevenire la ricorrenza della malattia nel corso dei cinque anni successivi, (III) sia come terapia di prima linea nel trattamento del carcinoma mammario metastatico.

La scelta della terapia ormonale dipende dalle terapie precedentemente ricevute e dalla localizzazione della malattia.

Le principali classi di farmaci utilizzati includono:

- Inibitori dell'aromatasi
- Terapie antiestrogeniche
- Analoghi dell'LHRH (LHRH)

Gli inibitori dell'aromatasi riducono la produzione degli ormoni estrogeni. In particolare, questa classe di farmaci inibisce il complesso enzimatico dell'aromatasi, responsabile della conversione degli androgeni a 19 atomi di carbonio (come il testosterone) in estrogeni a 18 atomi di carbonio (come l'estradiolo).

L'uso degli inibitori dell'aromatasi può essere applicato sia nel contesto adiuvante, per prevenire la ricorrenza del tumore dopo il trattamento primario, sia nel contesto metastatico, per il controllo della malattia avanzata. Questi farmaci sono assunti giornalmente per via orale e sono indicati esclusivamente per donne in stato postmenopausale. Si possono riscontrare degli effetti avversi comuni che includono vampate di calore, ipercolesterolemia, artralgia, affaticamento, aumento della sudorazione e nausea.

Un esempio di inibitore dell'aromatasi è il Letrozolo, che agisce inibendo l'enzima aromatasi, limitando così la produzione di estrogeni nei tessuti periferici. Riducendo la disponibilità di estrogeni, il Letrozolo limita l'azione stimolante di questi ormoni sulla crescita delle cellule tumorali del carcinoma mammario ER+. Gli effetti collaterali del Letrozolo possono includere vampate di calore, secchezza vaginale e osteoporosi.²²

23

Le terapie antiestrogeniche, come il Tamoxifene e il Fulvestrant, hanno la funzione di bloccare gli effetti degli estrogeni sulle cellule tumorali, impedendo il legame con i recettori e inibendo la crescita delle cellule tumorali.

Tuttavia, il Tamoxifene ha anche un effetto estrogenico parziale su alcuni tessuti, come l'osso e il tessuto endometriale.

Gli effetti avversi comuni di questo farmaco includono vampate di calore, perdite vaginali, e dimagrimento. Pertanto, l'uso del tamoxifene deve essere attentamente valutato dal medico in base alla situazione clinica specifica di ciascuna paziente.²⁴

Il Fulvestrant è utilizzato principalmente nella fase avanzata del carcinoma alla mammella ed è somministrato mensilmente per via intramuscolare. Questo farmaco agisce come un antagonista completo del recettore degli estrogeni nelle cellule tumorali, bloccando la trasduzione del segnale estrogenico. Il legame del Fulvestrant con il recettore degli estrogeni porta alla downregolazione dei recettori stessi, diminuendo così la disponibilità dei recettori per l'interazione con gli estrogeni

endogeni. Di conseguenza, viene bloccata l'azione stimolante degli estrogeni sulle cellule tumorali, ostacolando la crescita del tumore.

Fulvestrant agisce quindi come un'antagonista competitivo del recettore per gli estrogeni con affinità simile a quella dell'estradiolo, bloccando l'attività trofica degli estrogeni tramite la degradazione della proteina ER. Inoltre, essendo privo di attività estrogena, Fulvestrant riduce anche i recettori del progesterone e di Ki67.²⁵

Gli analoghi dell'*LH-releasing hormone* (LHRH) noti anche come *down-regulator* ipofisari, inducono la menopausa farmacologica mediante il blocco degli ormoni ipofisari che stimolano la sintesi degli estrogeni.

Questi farmaci sopprimono la produzione di ormoni sessuali attraverso una regolazione a livello ipotalamico-ipofisario. In particolare, gli analoghi dell'LHRH inizialmente stimolano l'ipofisi a rilasciare ormone luteinizzante (LH) e ormone follicolo-stimolante (FSH), i quali stimolano i testicoli o le ovaie a produrre testosterone o estrogeni. Tuttavia, l'effetto a lungo termine di questi trattamenti è quello di sopprimere l'attività dell'ipotalamo e dell'ipofisi, riducendo la produzione di LH e FSH e conseguentemente la produzione di testosterone o estrogeni. L'assunzione avviene per iniezione sottocutanea o per via intramuscolare. Questi farmaci interrompono il ciclo mestruale che può comunque riprendere nel giro di sei mesi o un anno dalla sospensione della terapia.²⁶

Un esempio di questa classe di farmaci è il Goserelin, il cui meccanismo d'azione si basa sul simulare l'azione dell'LHRH endogeno.

Goserelin è somministrato generalmente per via sottocutanea sotto forma di impianto, che rilascia gradualmente il farmaco nel tempo, o tramite iniezione. Gli effetti collaterali del Goserelin possono includere vampate di calore, riduzione della libido, osteoporosi e disturbi dell'umore.²⁷

Inibitori delle cicline

Gli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti serina/treonina (CDKi) rivestono un ruolo significativo nel controllo della crescita e dello sviluppo tumorale. In particolare, gli enzimi chinasi ciclina-dipendente 4 (CDK4) e chinasi ciclina-dipendente 6 (CDK6) svolgono un ruolo cruciale nei meccanismi d'azione di questi farmaci. Questi enzimi sono essenziali per la regolazione del ciclo cellulare, intervenendo specificamente nella fase G1. Durante questa fase, la cellula si prepara alla replicazione del DNA, un

processo che è fondamentale per la proliferazione cellulare. La CDK4 e la CDK6, in complesso con le cicline D, promuovono la progressione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare, attivando la trascrizione di geni necessari per la sintesi del DNA. L'inibizione di CDK4 e CDK6 impedisce quindi questa progressione, bloccando la proliferazione delle cellule tumorali e rappresentando un bersaglio terapeutico efficace nei trattamenti oncologici.

In condizioni fisiologiche, segnali mitogenici inducono l'espressione di cicline D1, D2 e D3, le quali attivano CDK4 e CDK6. Questi enzimi, a loro volta, fosforilano la proteina retinoblastoma (Rb) e le proteine Rb-associate (p130 e p107), che normalmente inibiscono il fattore di trascrizione E2F. La fosforilazione di Rb consente il rilascio di E2F, promuovendo così la trascrizione di geni coinvolti nel ciclo cellulare, nella replicazione del DNA e nella progressione della mitosi, fondamentali per il passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. In particolare, CDK4 regola la progressione attraverso la fase G1 del ciclo cellulare, preparando la cellula per l'inizio della sintesi del DNA, mentre l'espressione di CDK6 favorisce la progressione dalla fase G1 alla fase S.

Nei tumori, questo processo può essere alterato, con un'eccessiva attivazione di CDK4 e CDK6, interrompendo il ciclo cellulare e riducendo la crescita tumorale. Gli inibitori delle CDK4/6 agiscono bloccando l'attività di queste proteine, bloccando la proliferazione delle cellule neoplastiche attraverso l'interruzione della progressione del ciclo cellulare.

Nei tumori mammari HER2+ spesso si osserva un'elevata espressione della ciclina D, che può essere bersagliata per ridurre la crescita tumorale. Gli inibitori di CDK4/6 agiscono proprio in questo contesto, mantenendo la proteina Rb in uno stato ipofosforilato, bloccando così il rilascio di E2F.

I farmaci più utilizzati in questa classe sono palbociclib, ribociclib e abemaciclib come mostrato in figura (Fig. 4).

Il Palbociclib è un inibitore reversibile e altamente selettivo di CDK4 e CDK6. Viene utilizzato nel trattamento del carcinoma mammario ER+/HER2- in fase localmente avanzata o metastatica, in combinazione con un inibitore dell'aromatasi o fulvestrant.

Il Ribociclib, invece, è un inibitore selettivo di CDK4 e CDK6, con un'efficacia in vitro ben caratterizzata e anch'esso viene utilizzato nel carcinoma mammario ER+/HER2- in combinazione con terapie endocrine.

L'Abemaciclib è un inibitore potente e selettivo di CDK4 e CDK9, che ha dimostrato di essere efficace nel bloccare la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S, inibendo così la crescita tumorale. Questo farmaco è particolarmente utile nei casi di metastasi cerebrali grazie alla sua maggiore penetrazione nella barriera ematoencefalica.²⁸

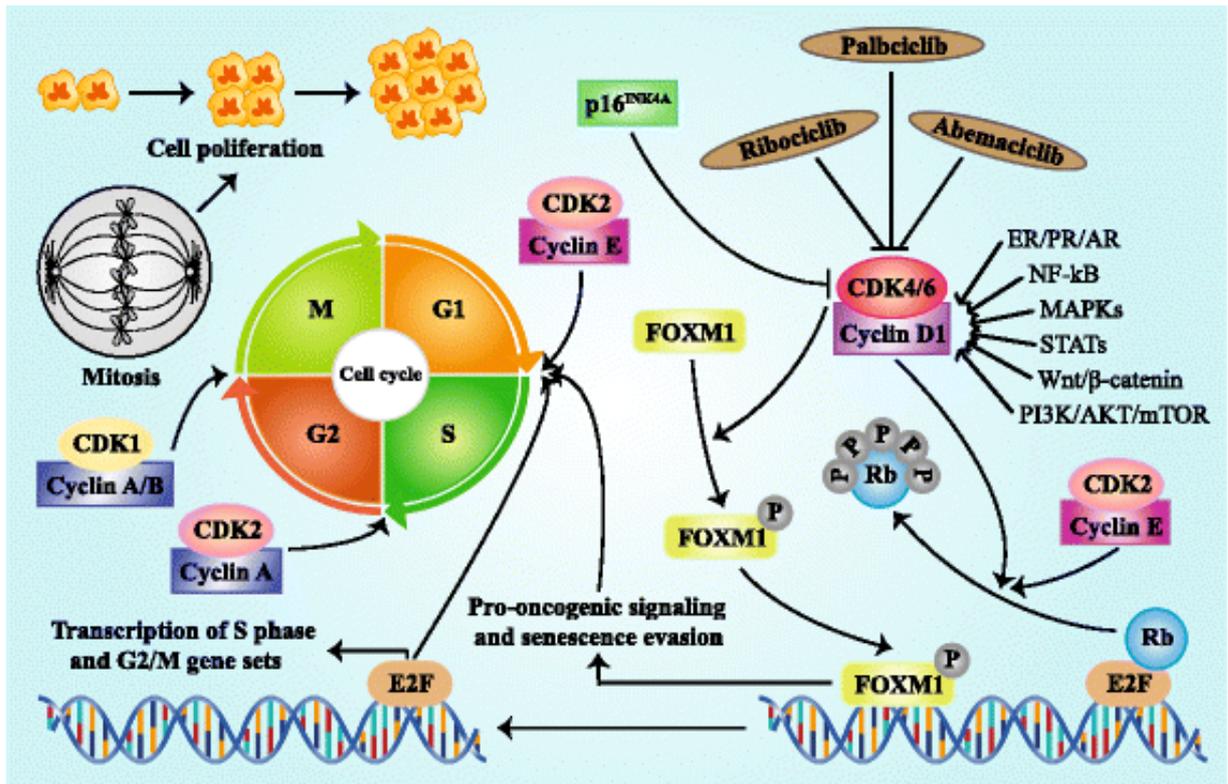


Figura 4 Regolazione e funzione di CDK4/6 nel ciclo cellulare. L'immagine illustra l'attività fosforilasi del complesso CDK4/6 e della ciclina D nei confronti della proteina Rb e del fattore di trascrizione FOXM1. La prima stimola l'up regolazione del fattore E2F il quale promuove la proliferazione cellulare mentre il secondo è direttamente implicato nell'espressione di geni che nella protezione delle cellule tumorali dagli inibitori del ciclo cellulare. Farmaci come Palbociclib, Ribociclib e Abemaciclib sopprimono l'attività chinasi delle cicline CDK4/6. Fonte: Xu, H., Yu, S., Liu, Q. et al. Recent advances of highly selective CDK4/6 inhibitors in breast cancer. *J Hematol Oncol* **10**, 97 (2017).

1.10.b Il ruolo del microambiente tumorale nel carcinoma mammario (TME)

Il microambiente tumorale (*Tumor MicroEnvironment* - TME) svolge un ruolo molto importante per la progressione, crescita e metastasi del tumore. Il TME è caratterizzato dalla presenza delle cellule tumorali che interagiscono con i linfociti infiltranti il tumore (*Tumor Infiltrate Lymphocytes* - TILs) e le cellule mieloidi, come macrofagi associati al tumore (*Tumor Associated Macrophages* - TAMs), cellule dendritiche e neutrofili e i fibroblasti associati al tumore (*Cancer Associated Fibroblast* – CAF). I TAMs possono assumere un fenotipo di tipo M2 pro-tumorale, promuovendo l'angiogenesi e sopprimendo l'immunità antitumorale, o di tipo M1, antitumorale.

I macrofagi M2 favoriscono l'accumulo di lipidi nel TME contribuendo alla progressione tumorale attraverso la secrezione di citochine e fattori di crescita che favoriscono la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali. Anche i CAF possono supportare la crescita tumorale mediante la secrezione di fattori di crescita (come TGF- β , VEGF, FGF) e rimodellamento della matrice extracellulare (*Extra Cellular Matrix* - ECM), facilitando l'invasione delle cellule tumorali e creando un ambiente immunosoppressivo che inibisce l'azione delle cellule T antitumorali.²⁹

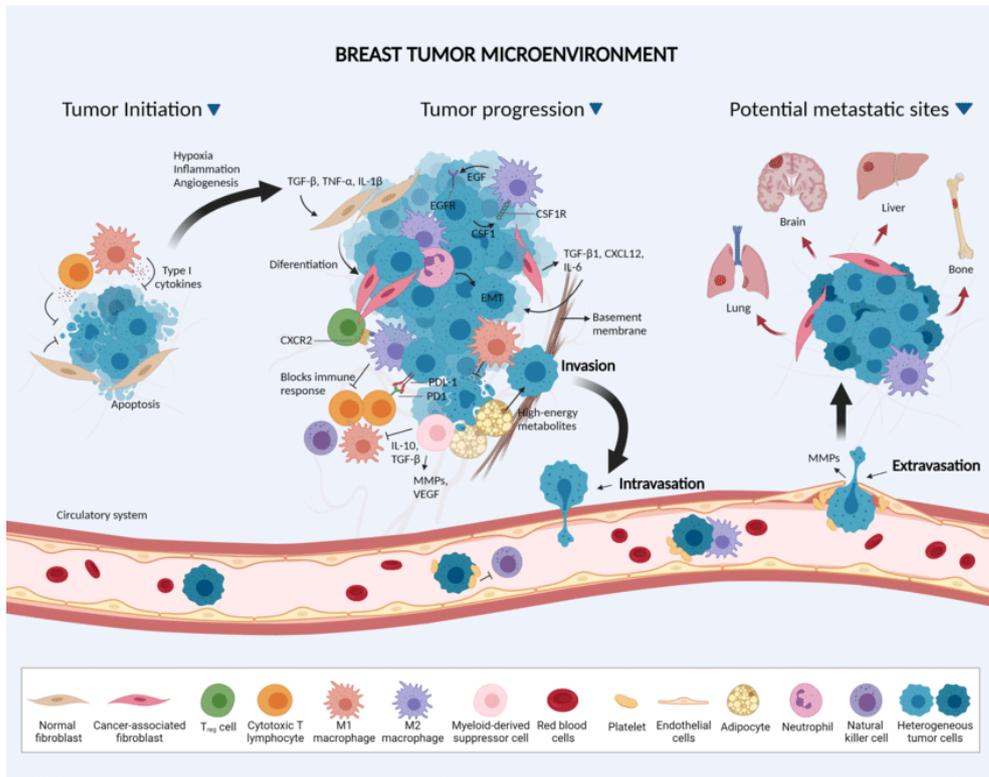


Figura 5 rappresentazione grafica delle componenti del microambiente tumorale di una neoplasia mammaria metastatica. Le citochine infiammatorie TGF- β , IL- β e TNF- α modulano la differenziazione dei fibroblasti in CAF che favoriscono il rimodellamento della matrice extracellulare e contribuiscono alla progressione tumorale tramite il rilascio di citochine. Le metalloproteasi e i fattori angiogenici favoriscono la diffusione tumorale tramite la circolazione. Fonte: Terceiro, Lucas E. L., Chidalu A. Edechi, Nnamdi M. Ikeogu, Barbara E. Nickel, Sabine Hombach-Klonisch, Tanveer Sharif, Etienne Leygue, and Yvonne Myal. 2021. "The Breast Tumor Microenvironment: A Key Player in Metastatic Spread" *Cancers* 13, no. 19: 4798.

È stato dimostrato che anche nel tumore alla mammella l'aumento di citochine (come IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β), chemochine (CCL17 o CCL27), proteasi (come le metalloproteinasi della matrice - MMP, MMP9, MMP3) e fattori di crescita (come il VEGF) influenzano la crescita tumorale, l'angiogenesi e contrastano la risposta immunitaria (Fig. 5).²⁹

1.11 Il sistema immunitario e il tumore

1.11.a Sistema immunitario

Il sistema immunitario rappresenta un complesso biologico fondamentale per la difesa dell'organismo contro agenti patogeni, cellule tumorali e il mantenimento dell'omeostasi. Le principali componenti del sistema immunitario sono:

- Barriere fisiche come la pelle e le mucose, che impediscono l'ingresso di agenti patogeni;
- Cellule Immunitarie che comprendono i linfociti B, che producono anticorpi, e i linfociti T, che distruggono cellule infette e coordinano la risposta immunitaria, e le cellule *natural killer* (NK);
- Fagociti come i macrofagi che ingeriscono e distruggono i patogeni;
- Organi linfatici come i linfonodi, il timo e la milza, che producono e attivano cellule immunitarie;
- Molecole solubili come gli anticorpi e le citochine, che aiutano a comunicare tra le cellule immunitarie e a coordinare la risposta.

I linfociti B sono suddivisi in diverse sottopopolazioni che ricoprono diversi ruoli:

- Cellule B *naive* (vergini)
- Cellule B di memoria: derivate dalle cellule B attivate che sono sopravvissute alla risposta immunitaria primaria. Conservano informazioni specifiche sugli antigeni incontrati e possono montare una risposta più rapida ed efficace in caso di riesposizione allo stesso antigene.
- Plasmablasti e plasmacellule: i primi migrano verso i tessuti infiammati e producono anticorpi. Possono differenziarsi in plasmacellule; mentre i secondi risiedono principalmente nel midollo osseo e producono grandi quantità di anticorpi specifici per un lungo periodo.
- Cellule B regolatorie (Breg) che svolgono un ruolo importante nel mantenimento della tolleranza immunologica e nella prevenzione delle malattie autoimmuni.

I linfociti T si dividono in diverse sottopopolazioni con funzioni specifiche:

- Linfociti T *helper* (Th): coordinano e regolano la risposta immunitaria, producendo citochine che attivano le altre cellule immunitarie.

- Linfociti T citotossici (CTL): specializzati nell'individuare e distruggere le cellule infettate da agenti patogeni o le cellule tumorali, mediante il rilascio di sostanze tossiche.
- Linfociti T regolatori (Treg): svolgono un ruolo cruciale nella soppressione delle risposte immunitarie e nella prevenzione delle reazioni immunitarie eccessive o autoimmuni, mantenendo la tolleranza immunitaria.
- Linfociti T memoria: si formano dopo la prima esposizione ad antigeni e sono in grado di rispondere rapidamente a successivi contatti con lo stesso antigene, garantendo una risposta immunitaria più efficace e più rapida.³⁰

1.11.b Legame tra sistema immunitario e cancro

La persistenza dello stato infiammatorio può favorire la trasformazione neoplastica e la conseguente crescita tumorale.

Il sistema immunitario svolge un ruolo cruciale nella sorveglianza e nella soppressione dei tumori mediante un processo che noto come *"immunoediting tumorale"*. Esso comprende tre fasi: eliminazione, equilibrio e *"escape"* (fuga).

Durante la fase di eliminazione, le cellule immunitarie identificano e distruggono le cellule neoplastiche nascenti. Se il sistema immunitario non riesce ad eliminare completamente le cellule tumorali, si crea una fase di equilibrio in cui il tumore e il sistema immunitario coesistono senza una crescita significativa della massa tumorale. Tuttavia, alcune cellule neoplastiche possono sviluppare mutazioni che consentono loro di sfuggire al riconoscimento da parte del sistema immunitario, portando alla fase di fuga, durante la quale la massa cancerogena cresce e si diffonde senza essere controllata dalle difese dell'organismo.

Le cellule tumorali possono adottare diversi meccanismi per eludere la risposta immunitaria, come ridurre l'espressione degli antigeni di superficie riconoscibili dalle cellule immunitarie o secernere molecole immunosoppressive che inibiscono l'attività delle cellule immunitarie. Inoltre, possono modulare il microambiente per favorire la crescita e la diffusione tumorale, ad esempio reclutando cellule immunosoppressive come i macrofagi M2 o le cellule T regolatorie.³¹

L'interazione tra le cellule del cancro al seno e quelle del sistema immunitario è regolata da cellule effettrici anticancro al seno del sistema immunitario, meccanismi di resistenza del cancro al seno all'immunità antitumorale, infiammazione pro-

tumorigenica nel cancro al seno e promozione dell'infiammazione di fenotipi aggressivi del cancro al seno positivo per ER α .

Il cancro al seno è spesso causato da cambiamenti genetici ed epigenetici nelle cellule epiteliali mammarie. Per prevenire lo sviluppo di quest'ultimo, esistono meccanismi di soppressione tumorale intrinseci come senescenza e apoptosi delle cellule neoplastiche ed estrinseci che possono eliminare le cellule trasformate e limitare la loro crescita.

È stato dimostrato che i linfociti T citotossici CD8 $^{+}$ (CTL) e le cellule natural killer (NK) sono coinvolte nel contrastare la crescita del tumore al seno; infatti, sembra che l'infiltrazione di linfociti T CD8 $^{+}$ sia associata ad una prognosi migliore per i pazienti, specialmente nei sottotipi ER α -negativi, HER2-negativi o di tipo basale. La chemioterapia combinata con l'immunoterapia potenzia l'attività citolitica dei linfociti citotossici contro il tumore al seno.

Per quanto riguarda le cellule NK, sembra che una ridotta attività sia associata alla progressione della malattia.³²

Le cellule del cancro al seno hanno sviluppato vari meccanismi per evitare la distruzione mediata dalle cellule immunitarie.

Un esempio è l'inibitore della proteinasi 9 (PI-9) che viene indotto dagli estrogeni con la funzione di proteggere le cellule del cancro al seno dall'uccisione mediata dalle cellule immunitarie. PI-9 è un inibitore della *granzyme B*, utilizzata dalle cellule CTL e NK per indurre l'apoptosi delle cellule bersaglio. La sovraespressione di PI-9 blocca l'apoptosi indotta dalle cellule NK e questo meccanismo è stato associato alla resistenza alla terapia con Tamoxifene in alcuni tumori ER α +. Altre molecole, come survivina, anti-apoptotiche, sono frequentemente sovra espresse nei tumori al seno e associate a una prognosi peggiore. La mancata espressione di BAX- α che promuove l'apoptosi, ad esempio, è molto comune nelle cellule del cancro al seno.³³

Inoltre, le cellule del cancro al seno possono esprimere ligandi immunoinibitori come PD-L1, HLA-E o HLA-G le quali sopprimono l'attività delle cellule immunitarie. La soppressione della segnalazione del fattore regolatore dell'interferone 7 (Irf7) nelle cellule del cancro al seno favorisce la metastasi. Il ripristino della segnalazione Irf7 mediante sovraespressione o trattamento con IFN- α 1 ha migliorato l'attività immunitaria, sopprimendo significativamente le metastasi ossee e prolungando la sopravvivenza.

Il TME nel tessuto mammario è composto da cellule immunosoppressive come le cellule T regolatorie (Treg) e le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC). Le Treg, reclutate nel TME possono contrastare l'attività delle cellule immunitarie promuovendo la crescita tumorale e la metastatizzazione.

Nel TME la presenza dell'Interleuchina-6 (IL-6), indotta transitoriamente dalla Proteina Chemoattraente dei Monociti-1 (MCP-1), crea un ciclo continuo di segnalazione infiammatoria che porta alla produzione costante di IL-6, trasformazione delle cellule del cancro al seno e tumorigenesi. In particolare, l'IL-6 facilita il reclutamento delle Cellule Staminali Mesenchimali (MSC) e la produzione di CXCL7, che favorisce la proliferazione delle Cellule Staminali del cancro al Seno (CSC). Inoltre, l'IL-6 promuove la resistenza al trastuzumab nel cancro al seno HER2+. Il blocco della segnalazione IL-8/CXCR1 riduce le CSC e le metastasi.

È stato dimostrato che la chemioterapia induce la produzione di TNF- α nelle cellule endoteliali e CXCL1/2 nelle cellule tumorali, facilitando il reclutamento delle MDSC. ³⁴

35

1.11.c Senescenza delle cellule e il loro legame con le SASP

La senescenza cellulare è un processo fisiologico che può essere innescato con il tempo e in risposta a determinati stimoli, come: lo stress metabolico, l'attivazione aberrante di oncogeni, l'infiammazione, le radiazioni e gli agenti chemioterapici.

La senescenza cellulare è processo irreversibile, definita come l'arresto proliferativo che avviene nelle cellule normali dopo un numero limitato di divisioni cellulari. Le cellule che entrano in senescenza non possono più dividersi anche se stimolate da mitogeni, ma rimangono metabolicamente e sinteticamente attive e mostrano caratteristiche morfologiche tipiche, come una forma cellulare ingrandita e appiattita e un aumento della granulosità.

Le cellule senescenti secernono una serie di fattori infiammatori e molecole bioattive, conosciuti come "*senescence-associated secretory phenotype*" (SASP) e comprendenti citochine pro-infiammatorie, chemochine, fattori di crescita, metalloproteinasi della matrice (MMP). A seconda del contesto fisiologico, la senescenza e la produzione di SASP possono avere un ruolo positivo o essere dannose per il tessuto o l'organismo.

In ambito oncologico, la senescenza cellulare è coinvolta sia in eventi antitumorali che pro-tumorali. In primo luogo, rappresenta un meccanismo fisiologico di soppressione tumorale, in quanto inibisce la proliferazione delle cellule neoplastiche, bloccando la progressione tumorale. D'altro canto, l'accumulo di cellule senescenti porta ad un deterioramento della riparazione tissutale e ad un'infiammazione cronica, promuovendo la progressione tumorale.

Anche le cellule del sistema immunitario vanno incontro a senescenza, per cui si parla di "immunosenescenza". Questo fenomeno rende gli individui più vulnerabili alle infezioni, alle malattie autoimmuni e al cancro. Durante l'immunosenescenza, si osservano diversi cambiamenti nella funzionalità del sistema immunitario:

- Ridotta risposta immunitaria, poiché i linfociti B e T mostrano una ridotta capacità di rispondere agli antigeni.
- Infiammazione cronica dove si verifica un aumento di marcatori infiammatori nel sangue, noto come stato di infiammazione cronica a basso grado (*inflammaging*). Questo stato può contribuire allo sviluppo di malattie croniche associate all'età.

- Diminuzione dei linfociti T *naive* ed aumento dei linfociti T memoria effettori (TEMRA).
- Ridotta capacità di attivazione poiché le cellule immunitarie diventano meno capaci di attivarsi in risposta agli stimoli, rendendo più difficile la risposta efficace contro nuove infezioni o agenti patogeni.

Come in tutte le cellule senescenti, anche in quelle del sistema immunitario si possono osservare i seguenti fenomeni:

- Accorciamento dei telomeri: i telomeri sono le estremità dei cromosomi e si accorciano ad ogni divisione cellulare. Quando essi diventano troppo corti, la cellula smette di dividersi e diventa inattiva o entra in uno stato di senescenza. Nei linfociti T, l'accorciamento dei telomeri è associato alla perdita di funzionalità e alla ridotta capacità di proliferare e rispondere agli stimoli esterni.
- Accumulo di danni al DNA.
- Alterazione nella regolazione genica: durante il processo di senescenza, possono verificarsi alterazioni nella regolazione dell'espressione genica, con conseguente aumento dell'espressione di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, nella risposta allo stress e nell'infiammazione. Queste alterazioni possono contribuire alla disfunzione dei linfociti T senescenti.
- Diminuzione della diversità del dominio variabile del recettore delle cellule T (TCR): con l'invecchiamento, si osserva una riduzione della diversità del recettore del dominio variabile delle cellule T, il che può limitare la capacità dei linfociti T di riconoscere e rispondere a una vasta gamma di antigeni. ^{36, 37, 38, 39,}

40

1.11.d Senescenza dei linfociti T

L'accumulo di linfociti T senescenti può favorire o meno la crescita tumorale. I linfociti T senescenti possono avere un'azione pro-tumorale in quanto:

- Possono perdere la loro capacità di riconoscere e distruggere le cellule tumorali;
- Possono rilasciare SASP con attività pro-infiammatoria; esse possono ridurre l'espressione di antigeni tumorali, indurre l'attivazione di molecole di checkpoint immunitario che inibiscono le risposte delle cellule T e secernere fattori immunosoppressivi.

Inoltre, è stato dimostrato che nei linfociti T senescenti è aumentata l'espressione delle proteine p21 e p16, coinvolte nel ciclo cellulare e nello specifico inibiscono le chinasi ciclina-dipendenti (CDK4/6), coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare.

Le cellule T senescenti subiscono modificazioni fenotipiche e funzionali che le distinguono dalle cellule T attivate o naive grazie a diverse proteine che sono espresse sulla loro superficie come:

- CD28 che è una proteina espressa sulla superficie delle cellule T attivate. Tuttavia, nelle cellule T senescenti, l'espressione di CD28 può diminuire o essere persa del tutto. CD28 è importante per la trasmissione del segnale di co-stimolazione che è necessario per l'attivazione ottimale delle cellule T.
- KLRG1 (*Killer Cell Lectin-like Receptor Subfamily G, Member 1*) è un marcatore di senescenza dei linfociti T. Le cellule T senescenti sono caratterizzate da un'alta espressione di KLRG1 e mostrano una ridotta capacità proliferativa e funzionale.
- CD57 è un marcatore di senescenza delle cellule e in particolar modo per i linfociti T. Esso è associato a una ridotta capacità proliferativa e a una funzione effettrice alterata.

Una delle funzioni principali delle cellule T senescenti è la produzione di citochine pro-infiammatorie e immunostimolanti che, come IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α , possono contribuire a rafforzare sia la risposta immunitaria innata che quella acquisita contro le cellule tumorali (Fig. 6). Queste citochine non solo attivano direttamente altre cellule immunitarie, come i macrofagi e le cellule NK, ma possono anche modulare il loro comportamento verso un profilo antitumorale più attivo.

Inoltre, le cellule T senescenti rilasciano segnali che influenzano il microambiente tumorale, favorendo condizioni che sono sfavorevoli per la sopravvivenza delle cellule tumorali. Ad esempio, possono indurre una maggiore attività fagocitaria nei macrofagi, che contribuisce alla rimozione delle cellule tumorali. Le cellule NK, stimolate dalle citochine prodotte dalle cellule T senescenti, aumentano la loro capacità di riconoscere e uccidere le cellule tumorali senza bisogno di una precedente sensibilizzazione antigenica.

Questa interazione sinergica tra cellule T senescenti, macrofagi e cellule NK è fondamentale per migliorare l'efficacia complessiva della risposta immunitaria antitumorale. Il loro ruolo non si limita alla distruzione diretta delle cellule tumorali ma include anche la modulazione dell'ambiente circostante per rendere il microambiente tumorale meno favorevole alla crescita e alla metastatizzazione delle cellule neoplastiche.

I linfociti T senescenti possono influenzare il microambiente tumorale al fine di renderlo meno favorevole alla crescita della massa stessa mediante la secrezione di fattori che limitano l'apporto di nutrienti o di sangue al cancro.

I linfociti T senescenti rappresentano una componente importante nella risposta immunitaria contro il cancro, contribuendo a modulare il microambiente tumorale in modo sfavorevole per la crescita e la sopravvivenza delle cellule neoplastiche. Queste cellule, attraverso la secrezione di citochine e fattori biologici, influenzano diversi aspetti critici del tumore. Ad esempio, producono citochine anti-angiogeniche come l'IL-12 e l'IFN- γ , che inibiscono la formazione di nuovi vasi sanguigni attorno al tumore, limitando così l'approvvigionamento di nutrienti e ossigeno alle cellule tumorali. Inoltre, alcuni linfociti T senescenti secernono fattori che promuovono la fibrosi e ostacolano la crescita tumorale mediante la formazione di tessuto fibroso intorno al tumore. Questo processo riduce lo spazio disponibile per la proliferazione delle cellule neoplastiche. Inoltre, alcuni studi suggeriscono che i linfociti T senescenti possono influenzare direttamente il metabolismo delle cellule tumorali, limitando la disponibilità di nutrienti essenziali come il glucosio e compromettendo così la loro capacità di crescere e proliferare. Complessivamente, l'azione dei linfociti T senescenti nel microambiente tumorale è cruciale per modulare la risposta immunitaria antitumorale e potrebbe rappresentare una promettente area di ricerca per lo sviluppo di terapie immunologiche innovative contro il cancro. ^{41, 42}

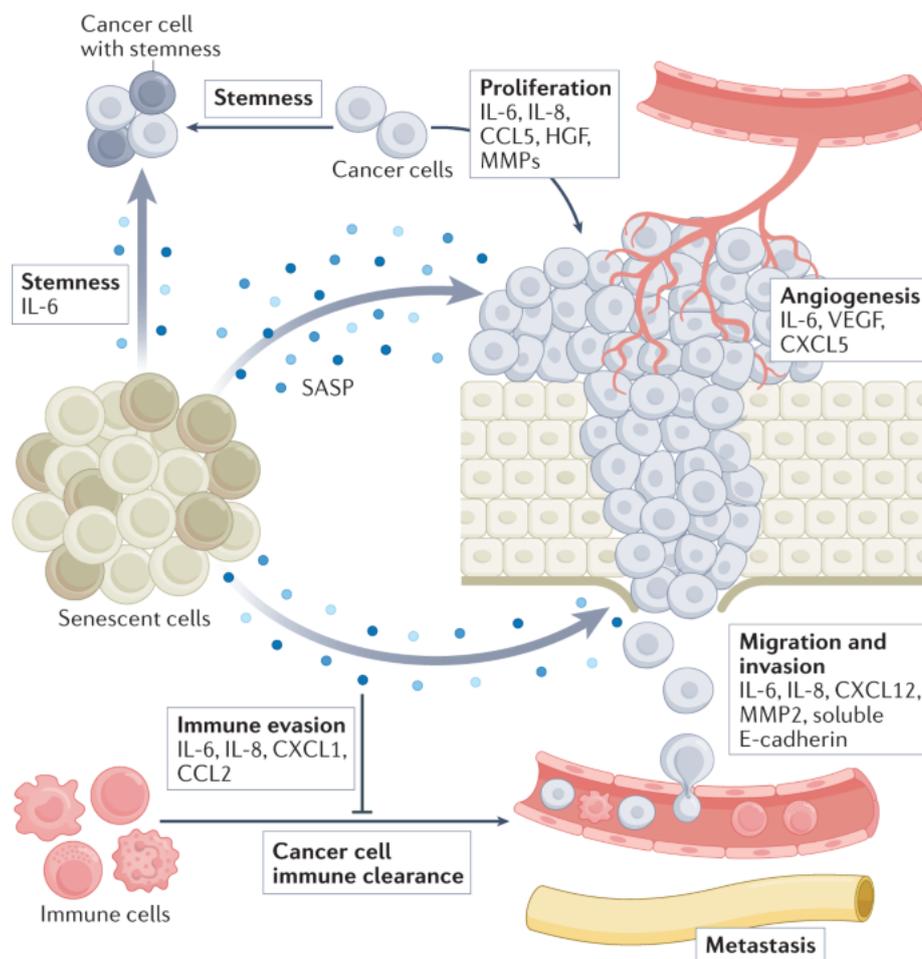


Figura 6 Attività delle cellule senescenti. L'immagine raffigura le numerose attività in cui sono coinvolte le cellule T senescenti nel contesto del carcinoma mammario metastatico. In particolare, si sottolinea la secrezione di fattori associati alla progressione tumorale quali interleuchine e metalloproteasi di matrice. La produzione e rilascio di SASP favoriscono la proliferazione e angiogenesi correlata a tumorale. Fonte: Schmitt, C.A., Wang, B. & Demaria, M. Senescence and cancer — role and therapeutic opportunities. Nat Rev Clin Oncol **19**, 619–636 (2022).

1.11.e Linfociti T esausti

Il termine “*T cell exhaustion*” (esaurimento dei linfociti T) viene usato per descrivere la risposta delle cellule T alla stimolazione cronica dell’antigene, inizialmente osservata nel contesto delle infezioni virali e successivamente estesa anche ai tumori.

L’*exhaustion* dei linfociti T è caratterizzata da una ridotta funzione effettrice, da un’espressione sostenuta di recettori inibitori e da uno stato trascrizionale distinto rispetto a quello delle cellule T effettrici funzionali o della memoria. Questo stato impedisce il controllo e la gestione ottimale delle infezioni e delle neoplasie.

Identificato oltre dieci anni fa come una disfunzione e successiva riduzione numerica delle cellule T specifiche per l’antigene durante le infezioni virali croniche nei modelli murini, l’esaurimento dei linfociti T è stato confermato in diversi modelli animali e nell’uomo, coinvolgendo non solo infezioni virali, ma anche batteriche, parassitarie e il cancro. Nonostante le specificità della disfunzione delle cellule T varino a seconda del patogeno, si sta delineando un quadro generale fenotipico e funzionale generale dell’esaurimento dei linfociti T.

Di recente, due temi emergenti hanno ampliato la comprensione dell’*exhaustion* delle cellule T. Primo, è stato riconosciuto che sia i segnali regolatori negativi esterni (come citochine immunoregolatorie) sia quelli interni alle cellule (come PD-1) giocano ruoli significativi nell’induzione e nell’evoluzione del fenomeno. In secondo luogo, si sta procedendo verso una definizione molecolare più precisa dell’esaurimento delle cellule T. In particolare, i *pathway* di regolazione negativa possono essere divisi in tre gruppi principale:

- Esposizione cronica agli antigeni tumorali.
- Presenza di inibitori immunitari che all’interno del microambiente tumorale, come PD-1 e CTLA-4.
- Competizione per le risorse.

Lo studio di questo fenomeno ha implicazioni cruciali per il successo delle terapie basate sui *checkpoint*. Infatti, la comprensione del ruolo e della regolazione delle cellule T esauste nel contesto del cancro è fondamentale per lo sviluppo di terapie immunologiche più efficaci. Strategie come il blocco delle vie di inibizione immunitaria o la modulazione delle vie di segnalazione coinvolte nell’esaurimento delle cellule T possono essere utilizzate per riattivare e potenziare la risposta immunitaria contro il tumore.

I recettori inibitori presenti sulla superficie cellulare, come PD-1, svolgono un ruolo chiave nell'immunità adattiva, promuovendo l'auto-tolleranza e prevenendo l'autoimmunità. Sebbene le cellule T effettrici funzionali possano esprimere in modo transitorio recettori inibitori durante l'attivazione, l'espressione prolungata e/o elevata di molti recettori inibitori è una caratteristica chiave dell'esaurimento delle cellule T CD8+ e CD4+ sia nei modelli animali che negli esseri umani. L'asse di PD-1 e il suo ligando (PD-L1) rappresenta una via recettoriale inibitoria principale nell'esaurimento delle cellule T; il blocco di questo *checkpoint*, se usato come *target* per le terapie, potrebbe permettere la riattivazione del meccanismo immunitario.

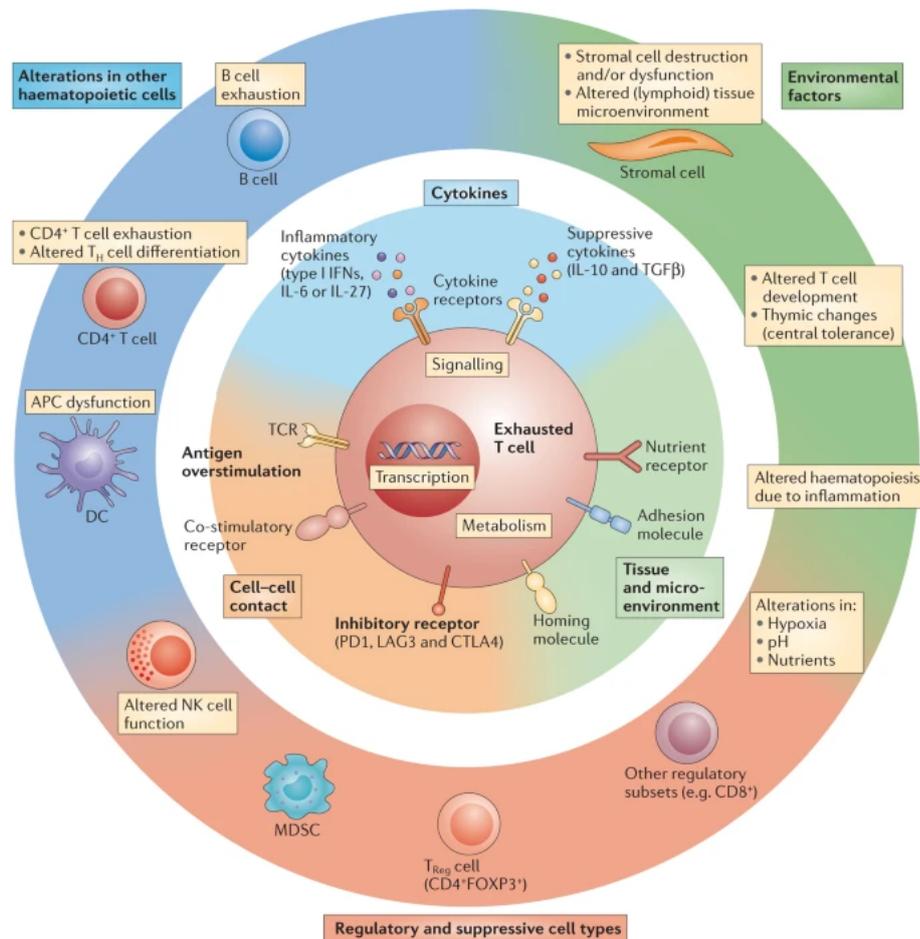
Oltre a PD-1, molti altri recettori inibitori controllano l'esaurimento delle cellule T, come LAG-3, CD244, CD160, TIM-3, CTLA-4 e molti altri. La co-espressione di questi recettori inibitori e la loro elevata presenza sulla superficie dei linfociti T influenzano significativamente la gravità della disfunzione come indicato nella figura (Fig. 7).

Il blocco simultaneo di più vie di *checkpoint*, come PD-1 e LAG-3, PD-1 e CTLA-4, o PD-1 e TIM-3, potenzia l'efficacia dell'immunoterapia perché questi *checkpoint* possono interagire sinergicamente e sovrapporsi nei loro effetti inibitori sulle cellule T. In altre parole, eliminare più di un meccanismo di soppressione può non solo aumentare il numero di cellule T attivate, ma anche migliorare la qualità della risposta immunitaria. Questo approccio ha dimostrato di essere particolarmente promettente nei trial clinici, dove ha portato a miglioramenti significativi nella sopravvivenza dei pazienti affetti da diverse forme di cancro avanzato.

È necessario comprendere i meccanismi che agiscono a valle dei recettori inibitori delle cellule T, come PD-1 e CTLA-4, durante l'esaurimento cellulare in quanto questi recettori influenzano diversi aspetti delle funzioni cellulari, come la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule T esauste. Sebbene i dettagli molecolari di questa regolazione non siano del tutto chiari, si ipotizza che i recettori inibitori possano attenuare le risposte riducendo la segnalazione e l'espressione genica di proliferazione e sopravvivenza. Inoltre, tali recettori possono interagire con una varietà di ligandi, suggerendo che l'ambiente circostante possa influenzare la funzionalità delle cellule T esaurite durante infezioni persistenti.

Nel contesto del cancro al seno, l'interesse per questi recettori di *checkpoint* deriva dalla loro capacità di limitare la risposta immunitaria contro le cellule tumorali. Gli anticorpi che bloccano PD-1, LAG-3 o TIM-3 hanno dimostrato di ripristinare la

funzione delle cellule T esauste e migliorare la risposta immunitaria contro il tumore in alcuni pazienti. Questa strategia, conosciuta come immunoterapia di *checkpoint*, ha portato a risultati promettenti nei pazienti con vari tipi di cancro al seno, soprattutto nelle forme più avanzate. ⁴³



Nature Reviews | Immunology

Figura 7 Attività mediate dalla exhaustion di linfociti T. L'immagine rappresenta i pathway implicati nella regolazione delle cellule t esauste. In particolare, si osserva l'attività delle citochine infiammatorie e dei recettori di inibizione PD-1, LAG 3 e TIGIT influenzano negativamente e sono implicate nei meccanismi di exhaustion. Fonte: Wherry, E., Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. Nat Rev Immunol 15, 486–499 (2015).

1.12 Lipidomica

La lipidomica è una branca delle scienze omiche che si occupa dello studio sistemico e globale dei lipidi che si possono trovare all'interno di un organismo, in una cellula o in un campione biologico. I lipidi sono una classe eterogenea di molecole che includono grassi, oli, steroli, fosfolipidi e altri composti simili. Questa disciplina fornisce informazioni dettagliate sulla composizione, struttura, funzione dei lipidi e sulle interazioni che questi elementi possono svolgere all'interno di un sistema biologico, contribuendo a comprendere meglio i loro ruoli nei processi fisiologici, nelle malattie come il cancro, e nello sviluppo di nuove terapie e trattamenti.

La lipidomica utilizza una varietà di tecniche analitiche avanzate, tra cui la spettrometria di massa, la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e la spettroscopia NMR (Risonanza Magnetica Nucleare), per separare, identificare e quantificare i lipidi presenti nei campioni biologici.⁴⁴

1.12.a Il potenziale impatto dei lipidi sul cancro

I lipidi svolgono funzioni biologiche essenziali all'interno del corpo umano, come fornire e immagazzinare energia, agire come molecole segnale e costituire componenti strutturali delle membrane cellulari. Tuttavia, un eccesso di lipidi può favorire la progressione tumorale e il processo di metastatizzazione.

La formazione delle metastasi implica che una cellula tumorale attraversi molteplici fasi che richiedono adattamenti metabolici e strutturali, supportati in particolar modo dai lipidi. Questi adattamenti includono (I) l'alterazione della composizione della membrana cellulare per facilitare l'infiltrazione nei tessuti circostanti, (II) il superamento dei meccanismi di morte cellulare, (III) la promozione del catabolismo e dell'anabolismo lipidico, e (IV) lo sviluppo di forme reattive dell'ossigeno (ROS) che favoriscono la crescita tumorale. Il metabolismo lipidico non è solo un mezzo per soddisfare le necessità energetiche delle cellule tumorali, ma è anche strettamente legato ai processi di segnalazione e proliferazione che guidano la progressione del cancro. Comprendere queste interazioni può aprire la strada a nuove strategie terapeutiche mirate.

L'obesità svolge un ruolo cruciale nella cancerogenesi, poiché diete ad alto contenuto di grassi possono alterare direttamente il metabolismo e gli stati cellulari dei tessuti, predisponendoli alla formazione di neoplasie.

Le diete ad alto contenuto di grassi comportano variazioni in diversi distretti dell'organismo umano che concorrono all'aumento della crescita della massa tumorale comportano:

- Riduzione della sorveglianza immunitaria: l'accumulo di lipidi all'interno delle cellule *natural killer*, mediato da PPAR- α o γ , comporta l'inibizione della glicolisi mediata da mTOR, favorendo così la progressione del tumore.
- Diminuzione dei linfociti infiltranti tumore (TILs) CD8+ in quanto diminuisce il metabolismo degli aminoacidi
- Limitazione dei nutrienti per le cellule T CD8+
- Inibizione dell'attivazione dei linfociti T CD4+
- Aumento delle MDSC sia circolanti che nel TME
- Disfunzione delle cellule dendritiche: queste cellule, fondamentali per il mantenimento della risposta immunitaria contro il tumore, perdono la loro efficacia.
- Aumento dell'infiammazione cronica: questa condizione produce neutrofilia polmonare e promuove le metastasi polmonari.

I principali lipidi coinvolti nello sviluppo e nel sostegno del tumore includono fosfolipidi, sfingolipidi, trigliceridi, acidi grassi e steroli. I fosfolipidi e gli sfingolipidi sono i principali componenti delle membrane cellulari e possono anche agire come molecole segnale con l'ausilio di prostaglandine e ceramidi. I grassi e gli oli hanno prettamente una funzione energetica e sono composti da acidi grassi e da una molecola di glicerolo o sfingosina. Tra gli steroli, il colesterolo è il più abbondante e funge da componente delle membrane cellulari, molecola segnale sistemica e precursore di ormoni e vitamine.

Inoltre, studi condotti su pazienti con il cancro alla mammella nel corso degli anni hanno evidenziato il ruolo della componente lipidica delle membrane cellulari nell'influenzare la sensibilità delle cellule neoplastiche durante la terapia. È stato osservato che le membrane cellulari con alta presenza di lipidi saturi risultano essere potenzialmente più resistenti ai trattamenti chemioterapici.

Alcuni lipidi invece, come fosfolipidi e acidi grassi, modulano le vie di segnalazione cellulari coinvolte nella crescita e nella sopravvivenza del tumorale, mentre altri possono fungere da mediatori nella trasduzione del segnale intracellulare, influenzando così la risposta al trattamento. Infine, le alterazioni del metabolismo lipidico possono agire sulla risposta terapeutica, attraverso l'induzione di processi infiammatori sistemici e la produzione di citochine.

È stato dimostrato come i sottotipi molecolari del cancro al seno abbiano un distintivo signature lipidica.

Ad esempio, nel sottotipo luminal A è stato osservato come il metabolita del colesterolo 27-HC, che agisce come agonista del recettore degli estrogeni, promuova la proliferazione delle cellule tumorali luminali ER+ e la crescita del tumore in modelli animali.

ACLY (*Acetyl-CoA Carboxylase*) è responsabile della produzione di malonil-CoA, un precursore essenziale nella sintesi degli acidi grassi a lunga catena. Questa molecola catalizza la conversione di acetil-CoA in malonil-CoA, il quale è fondamentale per l'inizio della biosintesi degli acidi grassi.

FASN (*Fatty Acid Synthase*) svolge un ruolo cruciale nella sintesi degli acidi grassi, un processo necessario per la formazione di membrane cellulari, la produzione di energia e l'accumulo di riserve lipidiche. FASN è coinvolto nella conversione di acetil-CoA e malonil-CoA in acidi grassi a catena lunga tramite una serie di reazioni enzimatiche. Entrambi gli enzimi sono fondamentali per la crescita e la proliferazione cellulare, specialmente in condizioni di rapida divisione; infatti, è stata osservata una correlazione positiva con l'espressione di Ki67.

L'elevata espressione di ACLY e FASN è stata associata a fenotipi tumorali più aggressivi e alla resistenza alla terapia, rendendoli potenziali bersagli per trattamenti anticancro mirati.

L'inibizione mirata di queste vie metaboliche, come quelle regolate da ACLY e FASN, rappresenta una prospettiva terapeutica promettente contro il cancro al seno.

Il bilancio redox dell'organismo, influenzato dall'accumulo di radicali liberi come il ROS, svolge un ruolo cruciale nello sviluppo e nella metastasi del cancro. I prodotti della perossidazione lipidica derivati da ROS possono indurre apoptosi cellulare attraverso danni irreversibili a lipidi, proteine e DNA. Tuttavia, la regolazione del ROS può anche avere effetti protettivi o promuovere l'infiammazione cronica e la tumorigenesi

attraverso il *pathway* NF- κ B. Il metabolismo lipidico è strettamente collegato alla biologia del cancro al seno, influenzando la crescita tumorale, la progressione e la risposta al trattamento. Comprendere le vie metaboliche specifiche del cancro al seno potrebbe portare allo sviluppo di nuove terapie mirate, migliorando l'efficacia del trattamento e potenzialmente riducendo la resistenza ai farmaci. ^{45, 46}

2. Scopo dell'elaborato

Circa il 75% dei carcinomi mammari sono ormono-positivi (ER+) ed HER2 negativi (HER2-). Anche se generalmente ha una prognosi migliore rispetto ad altri sottotipi, circa il 20-30% dei pazienti con cancro al seno ER+/HER2- in stadio iniziale svilupperà metastasi nel corso del tempo, anche molti anni dopo il trattamento iniziale. Uno degli approcci terapeutici più innovativi negli ultimi anni riguarda l'uso di inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti 4 e 6 (iCDK4/6). Tuttavia, nonostante i benefici che hanno dimostrato in molti pazienti, ci sono casi in cui questi farmaci non sono efficaci.

Risulta, quindi, fondamentale studiare quali potrebbero essere i meccanismi di resistenza. Fattori determinanti per un'efficace immunità antitumorale e terapia sono lo stato funzionale dei linfociti T ed il metabolismo dei lipidi che ne controlla differenziazione, sopravvivenza e funzioni effettrici. In condizioni di immunosoppressione e presenza di cellule tumorali, il metabolismo lipidico è alterato e favorisce l'induzione della senescenza dei linfociti T. Con tali premesse, lo scopo principale di questa tesi è quello di identificare nuovi marcatori plasmatici predittivi e prognostici in soggetti affetti da tumore mammario metastatico ER+/HER2- trattati con terapia ormonale e CDK4/6i al fine ultimo di migliorare non solo la prognosi dei pazienti, ma anche la terapia.

L'esperienza di tirocinio è stata svolta presso il Laboratorio di Onco-Immunologia del Centro di Ricerca Traslazionale di Malattie Autoimmuni e Allergiche dell'Università del Piemonte Orientale (CAAD-UPO) sotto la direzione della Professoressa Alessandra Gennari e della Dottoressa Veronica Martini. I dati trattati sono derivanti da attività sperimentali e di analisi condotte in loco.

A tal fine, in questo studio osservazionale di coorte, prospettico e traslazionale, abbiamo:

- Caratterizzato le cellule T senescenti ed esauste nel sangue periferico dei pazienti arruolati prima e dopo terapia, mediante citofluorimetria
- Analizzato il profilo lipidomico nel plasma dei pazienti prima dell'inizio della terapia, mediante spettrometria di massa
- Confrontato il profilo lipidomico in base alle sedi di metastasi (*ossee/soft tissue* vs viscerali)

- Correlato i risultati ottenuti sia in lipidomica che citofluorimetria con le caratteristiche cliniche

3. Materiali e metodi

3.1 Disegno dello studio e pazienti

In questa tesi sono stati analizzati 65 soggetti con tumore alla mammella in stadio avanzato trattati con terapia ormonale e CDK4/6i, di età compresa tra i 38 e gli 87 anni, afferenti alla S.C.D.U. di Oncologia del Dipartimento di Medicina Traslazionale (DIMET) dell'Azienda Ospedaliero Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara.

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

Tabella 3. Criteri di inclusione ed esclusione per la partecipazione al progetto

Criteri di inclusione	Criteri di esclusione
Età \geq 18 anni	Soggetti con condizioni psicologiche, familiari, sociali o geografiche che potrebbero costituire controindicazioni alla conformità e all'aderenza alle terapie proposte.
Firma e presa visione del consenso informato	
Tipologia di cancro mammario ER+/HER2 – metastatico	
Trattamento mediante CDK4/6i e terapia endocrina	

In occasione di una prima visita o di una di controllo periodica, i soggetti che ad una prima valutazione rispondono ai criteri di inclusione ed esclusione (Tab. 3), sono stati invitati a prendere parte allo studio e, dopo idonea informazione, è stato chiesto loro di firmare il consenso informato e il documento per la privacy dei dati dello studio (INFORMATIVA E MANIFESTAZIONE DI CONSENSO AL TRATTAMENTO DEI DATI PERSONALI - ai sensi degli artt. 13 e 14 del Reg. UE 2016/679).

Il CI definisce in modo chiaro e comprensibile gli obiettivi dello studio, i diritti e le responsabilità, i benefici e i rischi, le modalità di prelievo e di trattamento dei campioni, la garanzia dell'anonimato per tutta la durata dello studio, il trattamento dei dati al solo scopo scientifico, nonché la modalità di gestione dei dati e la possibilità di revocare il consenso in qualsiasi momento. Solo dopo che il paziente ha firmato il CI e modulo di *privacy*, viene anonimizzato assegnando un codice univoco di identificazione.

Successivamente viene programmato il prelievo secondo lo schema definito nel protocollo di studio e compilato un *database* (elettronico Case Report Form – eCRF) con le informazioni cliniche coerenti con lo scopo dello studio in questione.

Ai soggetti che hanno aderito allo studio, viene prelevato un campione di sangue in concomitanza ad un prelievo di sangue venoso ad uso clinico e i loro dati personali sono poi inseriti nella eCRF.

3.2 Procedura di raccolta e trasporto dei campioni biologici

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

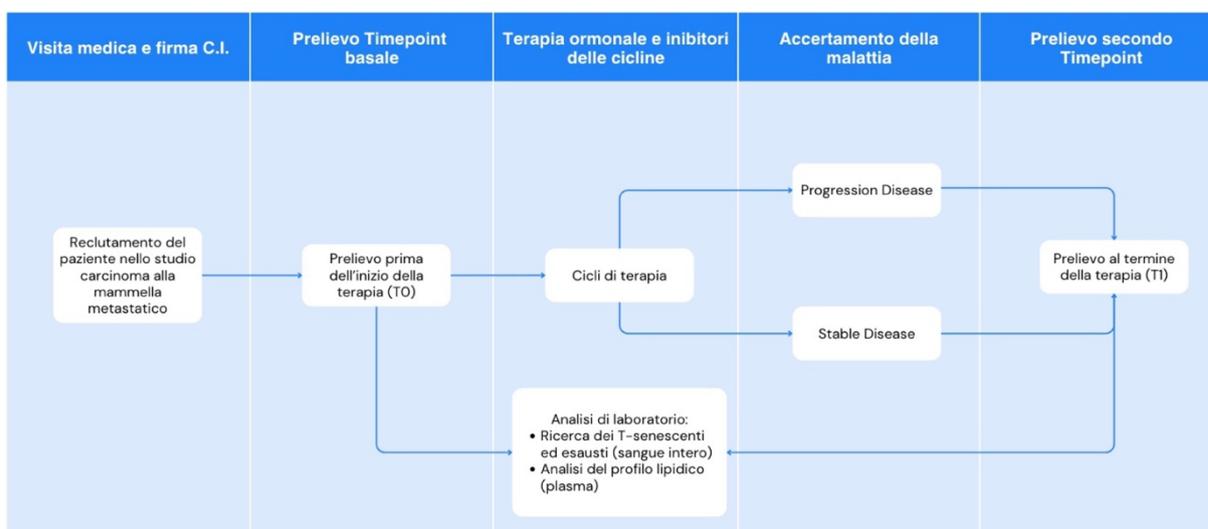


Figura 8 WorkFlow del progetto LIP1

Ciascuna provetta di sangue periferico viene etichettata segnando il codice univoco assegnato al soggetto, la data di nascita, quella del giorno del prelievo e il *timepoint* a cui è stata fatta la raccolta.

I campioni vengono poi inviati al laboratorio di Onco-Immunologia del Centro di Ricerca Traslazionale di Malattie Autoimmuni e Allergiche dell’Università del Piemonte Orientale (CAAD – UPO) e processati per le analisi entro le 24 ore dal momento del prelievo.

Dato che per tutti i campioni è prevista l’analisi citofluorimetrica sia direttamente su sangue periferico che su *Peripheral blood mononuclear cells* (PBMC), sono state scelte come provette di raccolta del campione quelle che presentano l’acido

etilendiamminotetracetico (EDTA) come anticoagulante presente all'interno, ovvero un composto chimico che agisce come chelante del calcio.

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

Le provette sono state processate al laboratorio di Onco-Immunologia del Centro di Ricerca Traslazionale di Malattie Autoimmuni e Allergiche dell'Università del Piemonte Orientale entro 4 ore dal prelievo. L'uso di un ambiente di lavoro sterile ed il rispetto delle norme di laboratorio da parte dell'operatore garantiscono la minimizzazione dei potenziali rischi di contaminazioni del campione durante la manipolazione e la sicurezza del personale coinvolto.

3.3 Staining dei linfociti T senescenti ed esausti

La metodica di *staining* dei linfociti T è stata eseguita mediante l'utilizzo di anticorpi coniugati a specifici fluorocromi per permettere la rivelazione citofluorimetrica al fine di evidenziare la presenza di linfociti senescenti ed esausti.

In questa tesi è stato usato il seguente protocollo:

1. Preparazione dei *tubes* (BD Bioscience, Milano, Italy) per la citofluorimetria
 - Per ogni campione sono stati allestiti due *tubes*, opportunamente segnati con il codice del paziente e la specifica delle marcature usate nelle *tube* stesso: UNS (*unstained*) per le *tube* contenute solo il sangue periferico (SP), che serve come controllo per l'autofluorescenza delle cellule stesse, e "ALL", per definire la *tube* contenute cellule e anticorpi marcati.
2. Preparazione dei campioni
 - Mettere 200 μL di sangue dalla provetta del prelievo per ciascuna *tubes* (UNS e ALL).
 - Aggiungere 1 mL di *Staining buffer* (3% FBS, 1x PBS) a ciascuna *tube*. Il *Fetal Bovine Serum* (FBS Biosigma, Verona, Italy) ha la funzione di agente bloccante, prevenendo legami non specifici e migliorando la specificità dei legami antigene-anticorpo. Inoltre, stabilizza le condizioni del tampone. Il *Phosphate Buffer Saline* (PBS Biosigma, Verona, Italy) è una soluzione tampone utilizzata per mantenere il pH e la stabilità delle

cellule o dei tessuti durante le analisi; esso coadiuva l'attività svolta dall'FBS e attenua il rumore di fondo causato dai legami non specifici. L'utilizzo di FBS e PBS garantisce risultati più affidabili e accurati.

3. Centrifugazione

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

4. Rimozione del surnatante

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

5. Risospensione del pellet

- Risospendere il *pellet* in 100 µL di Staining buffer (3% FBS, 1XPBS)

6. Aggiunta del *Viability Dye*™ (FV 780)

- Aggiungere 0,5 µL di *Viability Dye*™ (FV 780, BD Bioscience, Milano, Italy) in entrambe le *tubes*. Il *Viability Dye* è un colorante che permette di valutare la vitalità delle cellule. Le cellule non vitali hanno una membrana cellulare compromessa che consente al colorante di entrare all'interno di esse, rendendole quindi distinguibili al citofluorimetro.

7. Incubazione

- Incubare le *tubes* per circa 15 minuti a temperatura ambiente, ma protetti da fonti di luce diretta in quanto il *Viability Dye*™ è estremamente fotosensibile.

8. Lavaggio dei campioni

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

9. Preparazione finale dei campioni

- Risospendere il *pellet* in 100 μ L di *Staining buffer* (3% FBS, 1XPBS)
- Aggiungere solo nella *tube* "ALL" gli anticorpi come da tabella sotto riportata (Tab. 4).

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

Tabella 4 *Marcatori fluorescenti con funzione e quantità per l'analisi al citofluorimetro*

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

10. Seconda incubazione

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

11. Aggiunta del *Lysis Buffer*

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

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

12. Incubazione per la lisi degli eritrociti

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

13. Centrifugazione

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

14. Rimozione del surnatante

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

15. Ripetizione della lisi, se necessario

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

16. Risospensione finale del pellet

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

17. Acquisizione al citofluorimetro

- Acquisire al citofluorimetro

3.4 Citofluorimetria

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

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

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

Questo strumento permette l'analisi di marcatori di differenziamento cellulare, di superficie, intracitoplasmatici e intranucleari oppure la valutazione del contenuto cellulare di DNA. Attraverso la citometria a flusso è anche possibile fare analisi del ciclo cellulare, discriminare tra cellule vive, apoptotiche o necrotiche.

Per le analisi vengono adoperati tanti fluorocromi differenti che emettono a diverse lunghezze d'onda. ⁴⁷

La potenzialità di questa tecnica è la capacità di avere:

- La frequenza di una determinata popolazione, espressa in percentuale o come numero di eventi (singole cellule identificate dal citofluorimetro)
- 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. Dopo l'accensione si devono effettuare lavaggi con soluzioni

apposite (solitamente ipoclorito) per eliminare i residui di campioni delle acquisizioni precedenti.

- Sistema ottico: comprende i laser come fonte di luce e un sistema di indirizzamento dei fasci luminosi mediante l'utilizzo di specchi e prismi per convergere il raggio luminoso ai rivelatori fotomoltiplicatori. I sette laser che sono normalmente presenti hanno delle lunghezze d'onda diverse. Il citofluorimetro adoperato per l'analisi delle metodiche sopracitate è il BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer di BD Bioscience che presenta 5 laser con le seguenti lunghezze d'onda: ⁴⁸

Tabella 5 Laser FACSymphony A5 Cell Analyze. Fonte: <https://www.bdbiosciences.com/en-pl/products/instruments/flow-cytometers/research-cell-analyzers/bd-facsymphony-a5>

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

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

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

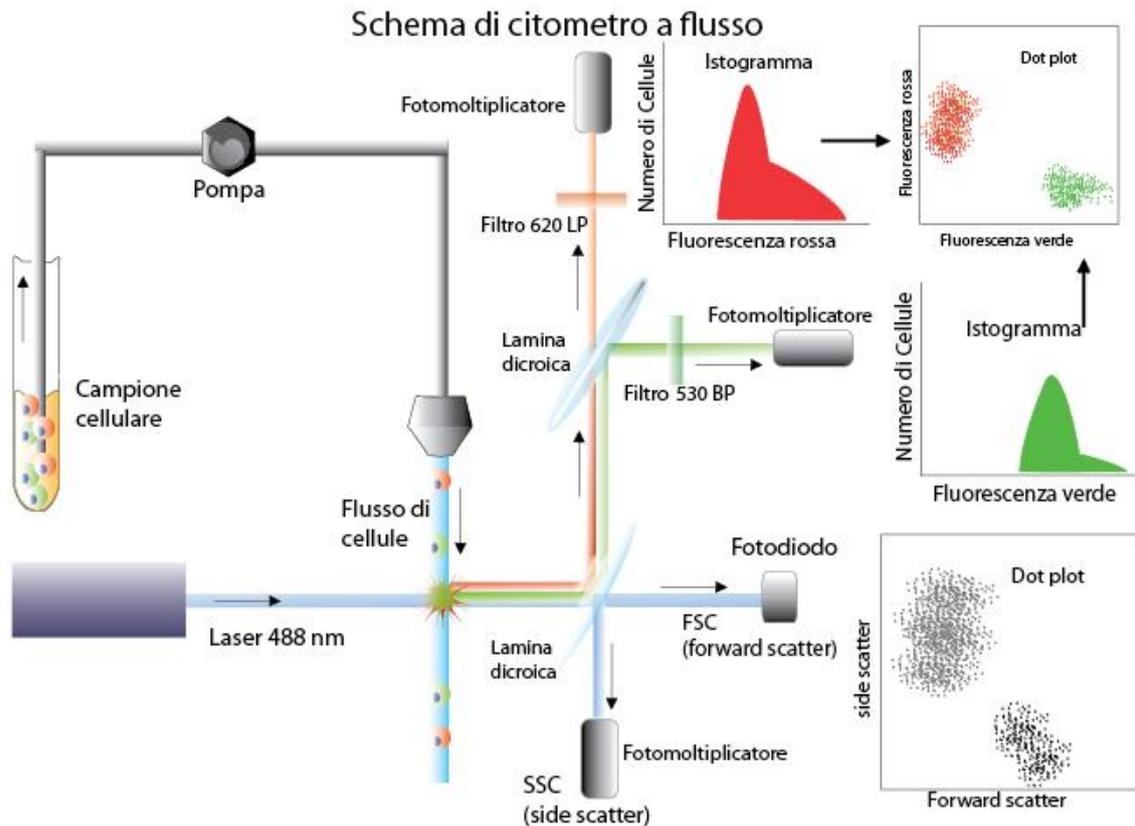


Figura 9 Illustrazione delle componenti e del flusso di lavoro del citofluorimetro. Fonte: <http://biologa.altervista.org/laboratorio-analisi/citometria-a-flusso/>

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. ⁴⁹

3.5 Gating strategy linfociti T senescenti ed esausti

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

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

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

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

1. Selezione delle cellule

- Gate morfologico, utilizzando in un plot a due dimensioni i parametri fisici *Forward Scatter* (FSC) e *Side Scatter* (SSC), in modo da identificare le sottopopolazioni linfocitarie in base alle loro dimensioni (FCS) e complessità (SSC).
- Gate "Singoletti", dove uno stesso parametro fisico viene definito in base a due dimensioni: FSC-A (A= Area) vs. FSC-H (H=Height); questo permette di escludere dall'analisi i cluster di più cellule-anticorpo.

2. Esclusione delle cellule morte

- *Viability Dye* vs. SSC-A, *dot-plot* per escludere le cellule morte, positive alla sonda, e quindi selezionare solo le cellule vive che sono negative per la stessa.

3. Selezione dei linfociti, utilizzando il marcatore CD45 come Pan-Linfocitario, dot-plot SSC-A vs CD45+, la selezione verrà fatta sulle cellule che risultano SSC-A^{low}CD45^{high/++}

4. Identificazione dei linfociti T

- CD3 vs. SSC-A, *dot-plot* che permette di identificare le cellule i linfociti T, CD3+

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

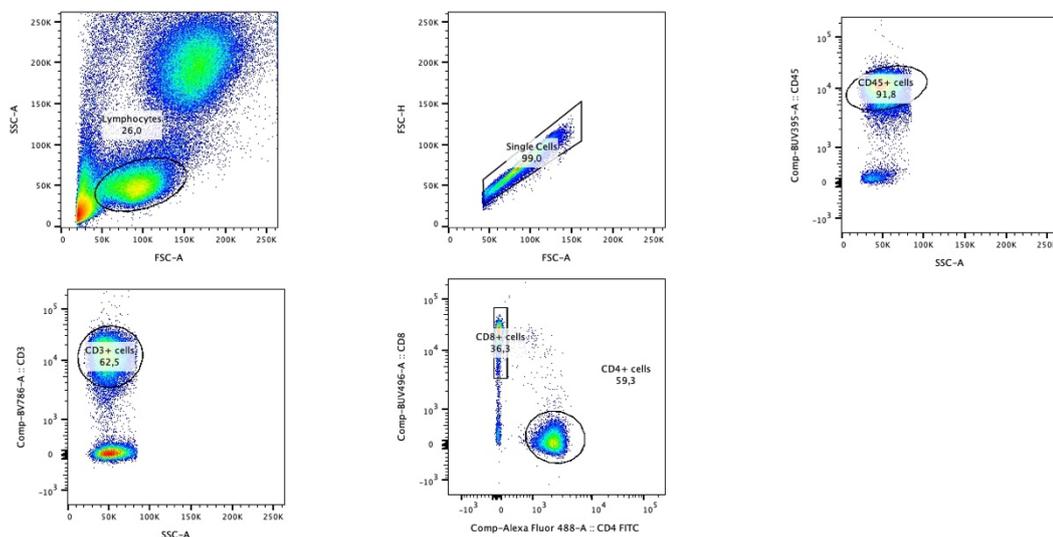


Figura 10: Gating strategy per l'individuazione di cellule CD3+, CD4+ e CD8+. Immagini acquisite con BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer di BD Bioscience

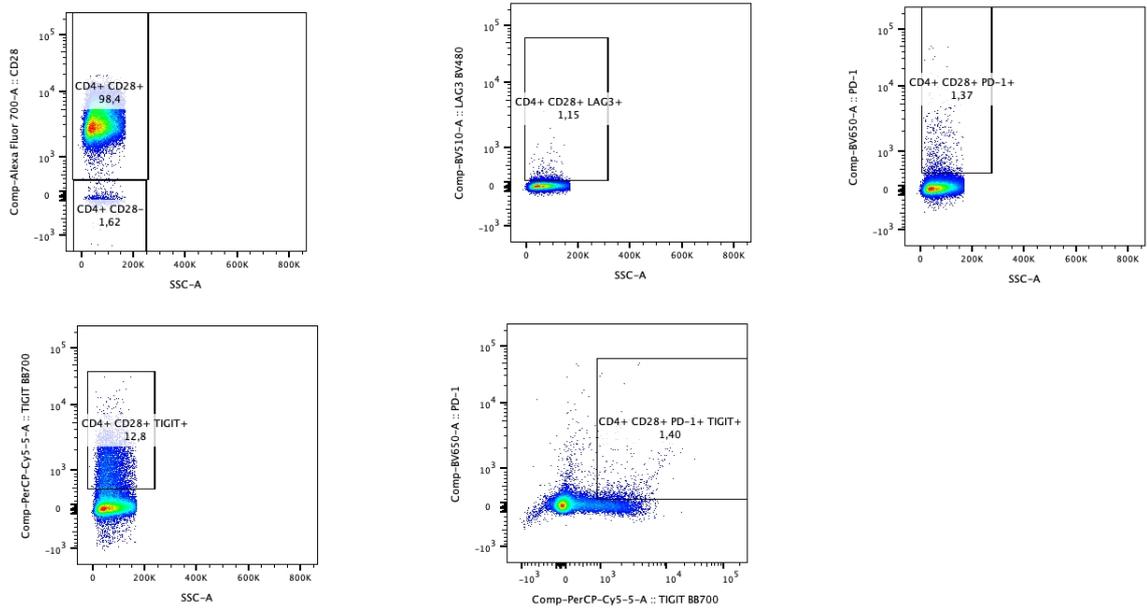


Figura 11: Gating strategy per l'identificazione delle cellule senescenti CD28+ mediante l'utilizzo di marcatori TIGIT, LAG3 e PD-1. Immagini acquisite con BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer di BD Bioscience

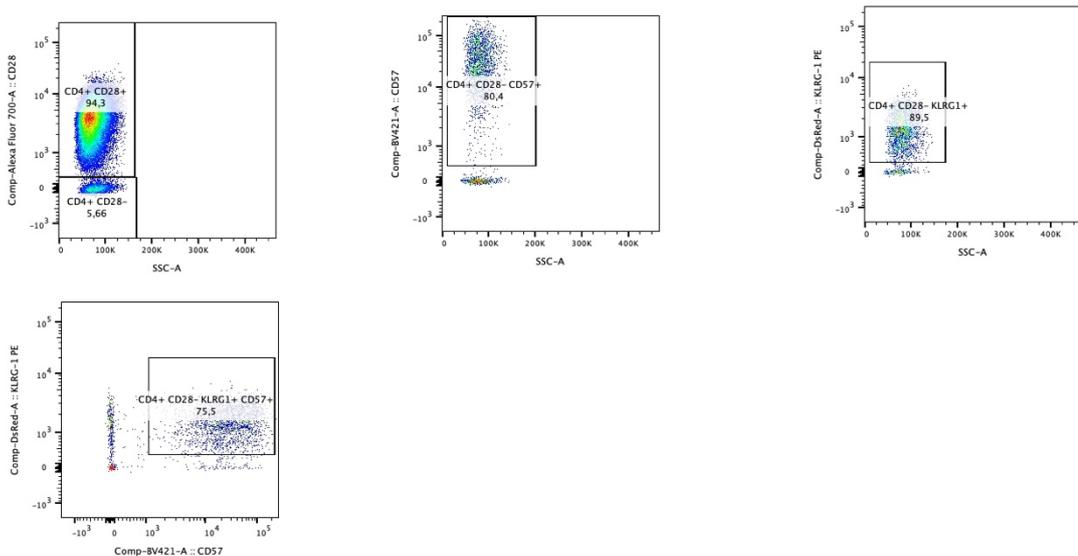


Figura 12: Gating strategy per l'identificazione di cellule esauste CD28- mediante l'utilizzo di marcatori CD57 e KLRG1. Immagini acquisite con BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer di BD Bioscience

Le immagini illustrano la *gating strategy* al fine di isolare le cellule senescenti ed esauste CD3+ ma la tecnica è applicabile anche alle popolazioni CD4+ e CD8+.

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

3.6 Plasma

L'analisi dei profili biochimici e lipidomici è cruciale per comprendere le alterazioni metaboliche associate a patologie complesse come il cancro. Questo studio mira ad effettuare una caratterizzazione della componente lipidica dei pazienti oncologici, utilizzando avanzate tecniche di spettrometria di massa per identificare nuovi biomarcatori potenzialmente associati alla malattia.

Il plasma è separato dal sangue intero rimuovendo i globuli rossi, i globuli bianchi e le piastrine. Tale processo viene interamente effettuato in regime di sicurezza e sterilità mediante l'utilizzo di una cappa BioHazard di classe II con sistemi di flusso laminare (DASIT GROUP™, SafeFAST Elite™, Milano, Italy).

In dettaglio sono riportate le fasi di svolgimento:

- 1) Trasferire in 2 provette da 1,5ml (Eppendorf, Biosigma, Verona, Italy) il sangue intero con una pipetta sterile dalla provetta del prelievo
- 2) Centrifugare le due provette a 400G per 10 minuti a 4°C (Centrifuge 5425/5425 R™ – microcentrifuga, Eppendorf™, Amburgo, Germany).

La temperatura di 4°C è stata selezionata per rallentare la denaturazione delle proteine presenti nel plasma, consentendo una migliore separazione delle diverse componenti senza comprometterne la qualità. Inoltre, la bassa temperatura riduce la velocità delle reazioni enzimatiche, contribuendo a mantenere stabili le caratteristiche del campione anche durante la centrifugazione.

- 3) Al termine della centrifuga, trasferire 250uL di plasma ottenuto in 4/5 provette da 0,5 mL (Biosigma, Verona, Italy) opportunamente segnate con il codice del paziente, il timepoint (T0 o T1) e la data del giorno del prelievo.
- 4) Conservare le provette da 0,5 mL contenenti il plasma nel frigorifero di laboratorio a -80°C (TSX Series Ultra-Low Upright Freezers™, Thermo Fisher Scientific™-Waltham, Massachusetts, USA). fino al momento in cui verrà usato.

3.7 Estrazione dei lipidi a partire da plasma e analisi lipidomica

La caratterizzazione del profilo lipidico è stata eseguita su plasma ottenuto da sangue periferico e conservato a -80 fino al momento dell'analisi. Nel dettaglio, sotto cappa biologica BioHazard di classe II con sistemi di flusso laminare (DASIT GROUP™, SafeFAST Elite™, Milano, Italy), sono stati trasferiti 5ml di sangue periferico in due provette da 1,5ml. Successivamente è stata eseguita una centrifugazione a 400g a 4°C per 10 minuti ed il plasma ottenuto è stato trasferito in provette da 0,75ml, opportunamente siglate con codice del paziente, data del prelievo e *timepoint* (T0 o T1) e conservate a -80.

L'estrazione dei lipidi dal plasma è stata effettuata mediante cromatografia liquida combinata con spettrometria di massa.

In dettaglio:

1. Estrazione:

- Introdurre 30 μ L di plasma in una provetta e miscelarli con 225 μ L di metanolo (MeOH) freddo contenente standard deuterati (Splash Lipidomix®). Il metanolo deve essere aggiunto freddo al fine di aiutare la precipitazione delle proteine e stabilizzare i composti di interesse per l'analisi. Gli standard deuterati sono composti chimici che contengono atomi di deuterio al posto dell'idrogeno. Questi standard vengono utilizzati come riferimento interno nelle analisi chimiche perché hanno proprietà chimiche quasi identiche ai composti non deuterati, ma possono essere distinti da questi ultimi con tecniche di spettrometria di massa. Splash Lipidomix® è un mix standard di lipidi deuterati utilizzati per calibrare e standardizzare l'analisi dei lipidi nel campione. Gli standard deuterati vengono aggiunti per consentire la quantificazione accurata dei lipidi nel campione, poiché fungono da riferimento interno per la calibrazione della strumentazione analitica.
- Agitare la soluzione con vortex per 10 secondi.
- Aggiungere 750 μ L di terz-butilmetilene (MTBE) freddo, seguito da 10 secondi di agitazione con vortex. Il MTBE è un solvente organico spesso utilizzato in laboratorio per estrarre lipidi e altre molecole non polari. Esso è immiscibile con l'acqua, il che significa che non si mescola con il plasma acquoso, ma estrae i composti non polari (come i lipidi) dal plasma. Il MTBE viene usato freddo al

fine di aiutare l'efficienza dell'estrazione e stabilizzare i composti sensibili alla temperatura; inoltre, essendo freddo, è in grado di minimizzare la degradazione dei lipidi e altre molecole sensibili al calore durante il processo di estrazione.

- Porre la provetta in un Thermomixer a 4 °C e agitare per 6 minuti a 2000 rpm. Il Thermomixer può riscaldare o raffreddare i campioni a una temperatura specifica, mantenendola costante durante il processo di miscelazione. Questo è essenziale per garantire condizioni uniformi e controllate durante l'estrazione o altre reazioni chimiche.
- Aggiungere 188 μ L di acqua ed agitare la provetta con vortex per 10 secondi, seguita da centrifugazione per 2 minuti a 14.000 rpm a 4 °C.
- Raccogliere 300 μ L del surnatante e procedere con l'evaporazione mediante uno SpeedVac. Il SpeedVac è un tipo di evaporatore rotante utilizzato principalmente in laboratorio per concentrare e asciugare campioni liquidi. Esso è un dispositivo progettato per rimuovere solventi volatili dai campioni, concentrandoli o asciugandoli completamente. Viene utilizzato in molte applicazioni di laboratorio, soprattutto in biochimica, chimica analitica e biologia molecolare.
- Reidratare il campione con con 50 μ L di una soluzione 9:1 di MeOH/toluene contenente lo standard interno CUDA (12,5 ng/mL).

2. Analisi di Cromatografia Liquida-Spettrometria di Massa

- Analizzare i campioni reidratati mediante un sistema UHPLC Vanquish (Thermo Scientific, Rodano, Italia) accoppiato con un Orbitrap Q-Exactive Plus (Thermo Scientific, Rodano, Italia)
- Effettuare la separazione con una colonna a fase inversa (Hypersil Gold™ 150x2.1 mm, dimensione particelle 1.9 μ m) mantenuta a 45 °C con una velocità di flusso di 0.260 mL/min. Utilizzare la fase mobile A per la modalità ESI positiva con acetonitrile/acqua (60:40 v/v) con formiato di ammonio (10 mmol) e acido formico allo 0,1%. L'acetonitrile è il solvente organico comunemente utilizzato in cromatografia liquida per la sua bassa viscosità e alta volatilità. Esso ha il compito di migliorare la solubilità di molti composti organici. L'acqua è un solvente polare essenziale per la solubilità di composti ionici e polari. La miscela di acetonitrile e acqua (60:40 v/v) rappresenta un equilibrio tra solubilità di composti polari e non polari. Il formiato di ammonio è un sale

utilizzato come tampone e agente di ionizzazione che aiuta a mantenere un pH stabile della fase mobile e facilita la formazione di ioni in modalità ESI positiva. L'acido formico è un acido organico debole aggiunto alla fase mobile per abbassare il pH. L'acido formico migliora la ionizzazione dei composti in ESI positiva, aumentando la sensibilità e l'efficienza della ionizzazione.

- Utilizzare la fase mobile B formata da isopropanolo/acetonitrile (90:10 v/v) con formiato di ammonio (10 mmol) e acido formico allo 0,1%.
- In modalità ESI negativa, i solventi organici per entrambe le fasi mobili sono gli stessi della modalità positiva, eccetto l'uso di acetato di ammonio (10 mmol) come modificatore della fase mobile.

3. Gradiente del Flusso:

Il gradiente utilizzato è stato il seguente:

- 0-2 minuti: dal 30% al 43% di fase mobile B.
- 2-2.1 minuti: dal 43% al 55% di fase mobile B.
- 2.1-12 minuti: dal 55% al 65% di fase mobile B.
- 12-18 minuti: dal 65% all'85% di fase mobile B.
- 18-20 minuti: dall'85% al 100% di fase mobile B.
- 100% di fase mobile B mantenuto per 5 minuti.
- Equilibratura della colonna al 30% di fase mobile B per 5 minuti.

Il tempo totale di esecuzione è di 30 minuti.

4. Analisi di Spettrometria di Massa:

- Effettuare l'analisi in modalità ione positivo (a 3.5 kV) e in modalità ione negativo (a 2.8 kV).
- Raccolta dei dati con la modalità di scansione dipendente dai dati top 10 (ddMS2).
- Acquisizione con l'utilizzo di spettri di indagine full-scan MS (intervallo di massa m/z 80–1200) con una risoluzione di $R = 70.000$ e un target AGC di 1×10^6 .
- Eseguire la frammentazione MS/MS mediante dissociazione ad alta energia C-trap (HCD) con una risoluzione di $R = 17.500$ e un target AGC di 1×10^5 .
- Impostare l'energia di collisione normalizzata (NCE) su 15, 30 e 45. La collisione normalizzata è un concetto importante in spettrometria di massa tandem (MS/MS), in particolare nella spettrometria di massa a collisione indotta al fine di controllare l'energia con cui gli ioni molecolari vengono frammentati durante

l'analisi. Essa viene espressa in percentuale e tiene conto della variazione dell'energia cinetica degli ioni precursori.

- Usare un volume di iniezione di 3 μ L.

Per svolgere l'analisi basata sulla massa accurata, sono stati utilizzati *Lockmass* e calibrazioni *interrun* regolari.

Il *Lockmass* è una tecnica utilizzata in spettrometria di massa per garantire la stabilità e la precisione della calibrazione della massa durante l'acquisizione dei dati che consiste nell'introduzione di un riferimento di massa noto e stabile (solitamente un picco o un insieme di picchi) nel sistema di spettrometria di massa insieme ai campioni da analizzare.

Le *calibrazioni interrun* regolari sono procedure eseguite periodicamente durante l'analisi sequenziale dei campioni per verificare e, se necessario, correggere la calibrazione dello spettrometro di massa. Queste calibrazioni sono eseguite tra le corse (*run*) analitiche dei campioni.

Una volta finita l'analisi, si genera una lista di esclusione per ioni di fondo testando lo stesso campione procedurale per entrambe le modalità ESI positiva e negativa.

5. Controllo di Qualità:

Il controllo qualità è stato assicurato analizzando campioni *pool* prima, all'inizio e alla fine dei lotti. Per verificare le interferenze residue vengono usati *Blanks* che sono dei campioni di controllo utilizzati per rilevare e verificare la presenza di interferenze residue o contaminazioni che potrebbero influenzare i risultati delle analisi. Un *Blank* è un campione che non contiene il/i composto/i di interesse, ma contiene tutti gli altri componenti del sistema analitico, come solventi, reagenti e materiali di consumo. Lo scopo di un *blank* è quello di rilevare eventuali interferenze o contaminazioni provenienti da questi componenti o dall'ambiente. Prima dell'analisi mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS), sono stati incorporati nei campioni di plasma degli standard interni contenenti diversi tipi di analiti, a concentrazioni adeguate al plasma. In particolare, è stato impiegato uno standard interno denominato CUDA, unitamente a una serie di standard interni presenti nella miscela di lipidi Avanti SPLASH Lipidomix.

6. Elaborazione dei Dati

I dati grezzi sono ottenuti da un'analisi *untargeted* che consente di rilevare una vasta gamma di metaboliti senza una preselezione specifica. I risultati così ottenuti vengono elaborati con il *software* MSDIAL (Yokohama City, Kanagawa, Giappone), versione 4.24.

Grazie al processo di elaborazione dei dati, i picchi di massa sono identificati e deconvoluti, cioè separati dai dati MS/MS per ottenere informazioni dettagliate sulla composizione molecolare dei lipidi. Successivamente, i picchi che sono stati ottenuti vengono allineati tra tutti i campioni analizzati. Questo passaggio è importante al fine di garantire la comparabilità dei dati tra i diversi campioni e per ridurre la variabilità sperimentale.

Per svolgere la quantificazione in modo corretto si normalizzano le aree dei picchi delle diverse specie molecolari rilevate utilizzando lo standard interno deuterato per ciascuna classe lipidica. Questo standard interno serve a compensare le variazioni nelle condizioni sperimentali e di strumentazione, assicurando risultati quantitativi più precisi. Le aree normalizzate dei picchi sono moltiplicate per la concentrazione nota dello standard interno deuterato. Questo calcolo permette di stimare la concentrazione dei lipidi nel plasma, espressa in nmol/mL.

Per identificare i lipidi si utilizza una libreria di standard interni che contiene spettri di massa di lipidi noti che vengono confrontati con i dati acquisiti per confermare l'identità dei lipidi trovati nei campioni.

Infine, per l'analisi statistica è stato usato il *software* MetaboAnalyst 4.0 (www.metaboanalyst.org) che comprende l'analisi multivariata, l'identificazione di pattern metabolici significativi tra i campioni e l'interpretazione dei risultati per comprendere le differenze tra gruppi sperimentali o condizioni.⁵⁰

3.8 Analisi statistiche

L'analisi statistica della frequenza delle sottopopolazioni di linfociti T senescenti ed esausti nei vari sottogruppi di pazienti analizzati è stata eseguita utilizzando il test non parametrico di Mann-Whitney U e di Kruskal-Wallis. I dati sono stati espressi come media \pm errore standard (ES) della media. Per l'analisi di sopravvivenza sono state utilizzate curve di sopravvivenza Kaplan-Meier, il test del *log-rank*. I dati sono stati considerati statisticamente significativi solo per valori con $p < 0,05$ o $p < 0,01$. IL software Graph-Pad Prism v10 è stato utilizzato come programma di analisi statistica.

4. Risultati

4.1 Descrizione della popolazione in studio

Le caratteristiche generali delle 58 pazienti incluse nello studio sono riassunte nella tabella successiva (Tab. 6)

L'età mediana della popolazione è di 69 anni, con un intervallo di valori compreso tra 38 e 87, di cui 34 pazienti (58,62%) con età >65 anni e 24 pazienti con età ≤65 anni (41,38%).

La mediana del BMI nella popolazione studiata è pari a 24,34 kg/m², di cui: 35 pazienti (60,34%) sono normopeso (BMI 18,5 - 24,9 kg/m²), 8 pazienti (13,80%) sono sovrappeso (BMI 25 - 29,9 kg/m²), 8 pazienti (13,80%) sono obesi (BMI ≥ 30 kg/m²) e 2 pazienti (3,45%) sono sottopeso (BMI ≤ 18,5 kg/m²). Di 5 pazienti il BMI non è stato possibile calcolarlo per mancanza di informazioni.

In merito alle sedi di metastasi: 5 pazienti (8,62%) presentano metastasi in 4 sedi, 15 pazienti (25,86%) in 3 sedi, 14 pazienti (24,14%) in 2 sedi e 24 pazienti (41,38%) con una sola sede metastatica. Le metastasi dei tumori ER+/HER-2- sono prevalentemente localizzate nell'osso, nei tessuti molli adiacenti o nelle aree viscerali. Per quanto riguarda l'espressione di ki67, abbiamo considerato, nella corrispondente analisi, tre gruppi prognostici: 15 (25,86%) con un basso livello di indice di proliferazione di Ki-67 (≤ 14%, *low*), 8 (13,80%) con un livello intermedio (15% < x ≤ 20%, *intermediate*) e 25 (43,11%) con un livello elevato (> 20%, *high*).

Lo stesso gruppo di pazienti è stato diviso anche per l'espressione positiva e negativa di HER2+ dove sono suddivisi in modo equo: 30 (51,72%) sono negativi e 27 (46,55%) sono positivi.

Prendendo in considerazione l'espressione dei recettori ER e PgR, importanti marcatori biologici per diagnosi e classificazione in sottotipi del carcinoma alla mammella, è possibile vedere che la maggior parte delle pazienti (41 pazienti, 70,69%) presentano un'espressione di ER compresa tra 81 e il 100%; mentre per PgR un consistente numero di pazienti è distribuito tra i range di 0-20% (22 pazienti, 37,93%) e 81-100% (16 pazienti, 27,59%).

Nella coorte in studio, 19 pazienti (32,76%) hanno ricevuto Abemaciclib, 15 pazienti (25,86%) Palbociclib e 24 pazienti (41,38%) Ribociclib. Mentre la terapia ormonale è stata somministrata con Anastrozolo a 3 pazienti (5,17%), Letrozolo a 35 pazienti

(60,34%), Fulvestrant a 16 pazienti (27,59%) ed Exemestane alle restanti (6,90%). Al momento, 33 pazienti (56,89%) continuano ad assumere il trattamento con CDKi ed ormonoterapia con efficacia mentre le restanti hanno sospeso il trattamento (43,11%) di queste ultime 19 pazienti (76%) hanno mostrato progressione della malattia (PD), 3 pazienti (12%) hanno riscontrato tossicità legata alla terapia, cambiando così trattamento, e 3 pazienti (12%) sono decedute.

Tabella 6 Caratteristiche generali e cliniche delle pazienti arruolate nello studio

Caratteristiche della popolazione in studio	Numero (%)
Età	
Mediana	69 (da 38 a 87)
Media	66,60
>65 anni	34/58 (58,62%)
≤ 65 anni	24/58 (41,38%)
BMI	
Mediana	24,34 (da 17,36 kg/m ² a 36,8 kg/m ²)
Normopeso (da 18,5 kg/m ² a 24,9 kg/m ²)	35/58 (60,34%)
Sovrappeso (da 25 kg/m ² a 29,9 kg/m ²)	8/58 (13,80%)
Obeso (≥ 30 kg/m ²)	8/58 (13,80%)
Sottopeso (≤ 18,5 kg/m ²)	2/58 (3,45%)
Non disponibile	5/58 (8,62%)
Numero di metastasi	
1 metastasi	24 (41,38%)
2 metastasi	14 (24,14%)
3 metastasi	15 (25,86%)
4 metastasi	5 (8,62%)
Localizzazione delle metastasi	
Oso + tessuto molle	29/58 (50%)
Viscerale	51/58 (87,93%)
Espressione di Ki-67 %	48/58 (84,58%)
≤ 14% low	15/58 (25,86%)
15% < x ≤ 20% intermedie	8/58 (13,80%)
> 20%, high	25/58 (43,11%)
Non disponibile	10/58 (17,24%)
Espressione recettoriale ER	58/58 (100%)
0%- 20%	2/58 (3,45%)
21%-40%	3/58 (5,17%)
41% - 60%	2/58 (3,45%)
61% - 80%	10/58 (17,24%)
81% - 100%	41/58 (70,69%)
Espressione recettoriale PgR	56/58 (96,55%)
0%- 20%	22/58 (37,93%)
21%-40%	4/58 (6,90%)
41% - 60%	6/58 (10,34%)
61% - 80%	8/58 (13,80%)
81% - 100%	16/58 (27,59%)
Non disponibile	2/58 (3,44%)
Espressione di HER-2	
Negative (valore 0)	30/58 (51,72%)
Low (valore 1 o 2)	27/58 (46,55%)
Non disponibile	1/58 (1,73%)
Tipologia di inibitore delle cicline per la terapia	
Abemaciclib	
Palbociclib	19/58 (32,76%)
Ribociclib	15/58 (25,86%)
	24/58 (41,38%)
Tipologia di terapia ormonale	
Anastrozolo	3/58 (5,17%)
Letrozolo	35/58 (60,34%)
Fulvestrant	16/58 (27,59%)
Exemestane	4/58 (6,90%)
Stato del paziente	
Trattamento con CDK4/6i in atto	33/58 (56,89%)
Trattamento con CDK4/6i finito	25/58 (43,11%)
- PD	- 19 (76%)
- Morte	- 3 (12%)
- Tossicità	- 3 (12%)

4.2 Caratterizzazione dei linfociti T senescenti ed esausti circolanti nei pazienti con malattia stabile/risposta parziale (SD/PR) ed in progressione di malattia (PD) prima dell'inizio della terapia.

4.2.a Valutazione della frequenza delle sottopopolazioni nei due gruppi di pazienti: SD/PR vs PD

Allo scopo di definire un ruolo predittivo di risposta alla terapia con CDK4/6i, abbiamo caratterizzato mediante citometria a flusso i linfociti T circolanti nei pazienti in studio prima dell'inizio della terapia (al *baseline*). A tale scopo abbiamo suddiviso i 36 pazienti considerati per questa analisi in due gruppi: con malattia stabile o risposta parziale (n=24; SD/PR) al *follow-up* e con progressione di malattia o deceduti (n=12; PD).

In tabella (Tab. 7) sono riportati i valori di mediana e deviazione standard (DS) delle sottopopolazioni di linfociti T circolanti analizzati per i due gruppi di pazienti (SD/PR e PD). I valori delle mediane sono stati ottenuti dalle frequenze di ogni sottopopolazione di linfociti T espresse in % sul totale di linfociti T CD3+.

Tabella 7 Valori di mediana e deviazione standard (DS) delle diverse popolazioni di linfociti T esausti, exhausted like, senescenti e senescent-like nel gruppo di pazienti SD/PR (n=24) e PD (n=12).

Popolazione	Gruppo SD/PR		Gruppo PD		P-value
	Mediana (%)	DS	Mediana (%)	DS	
CD3+ CD28+	88,75	15,04	73,25	23,99	0,0656
CD3+ CD28+ LAG3+	0,4850	0,2336	0,560	0,6181	0,6371
CD3+ CD28+ PD1+	1,145	0,8500	1,250	1,298	0,2615
CD3+ CD28+ TIGIT+	6,625	4,603	4,565	3,720	0,1389
CD3+ CD28+ PD1+ TIGIT+	0,6100	0,4544	0,8200	1,154	0,2988
CD3+ CD28+ PD1+ LAG3+ TIGIT+	0,0800	0,1100	0,06500	0,2316	0,7977
CD4+ CD28+	62,05	13,68	54,45	20,21	0,0656
CD4+ CD28+ LAG3+	0,2350	0,2116	0,2500	0,1995	0,6369
CD4+ CD28+ PD1+	0,3650	0,3759	1,040	0,9231	0,0038
CD4+ CD28+ TIGIT+	5,530	3,733	3,640	2,345	0,4120
CD4+ CD28+ PD1+ TIGIT+	0,4150	0,2970	0,2950	0,4106	0,8882
CD4+ CD28+ PD1+ LAG3+ TIGIT+	0,2150	0,3329	0,1350	0,2569	0,6852
CD8+ CD28+	13,50	6,908	17,10	9,669	0,7345
CD8+ CD28+ LAG3+	0,1950	0,1085	0,2400	0,2435	0,7974
CD8+ CD28+ PD1+	0,3300	0,2428	0,4750	0,4462	0,3743
CD8+ CD28+ TIGIT+	1,705	1,295	1,515	0,9481	0,5400
CD8+ CD28+ PD1+ TIGIT+	0,1050	0,1746	0,1035	0,2992	0,8883
CD8+ CD28+ PD1+ LAG3+ TIGIT+	0,02850	0,04251	0,02500	0,06879	0,6252
CD3+ CD28-	13,45	15,17	26,95	24,21	0,1533
CD3+ CD28- CD57+	10,70	11,84	16,20	10,04	0,9544
CD3+ CD28- KLRG1+	12,50	14,54	14,65	11,22	0,8757
CD3+ CD28- CD57+ KLRG1+	9,430	11,46	12,65	9,903	0,6791
CD4+ CD28-	2,605	4,871	3,080	17,57	0,5795
CD4+ CD28- CD57+	1,345	4,310	1,075	2,002	0,3439
CD4+ CD28- KLRG1+	2,475	4,764	0,9500	2,490	0,4021
CD4+ CD28- CD57+ KLRG1+	1,340	4,266	0,6750	2,048	0,1741
CD8+ CD28-	10,34	10,42	13,75	10,14	0,5674
CD8+ CD28- CD57+	8,205	7,504	11,34	8,350	0,8238
CD8+ CD28- KLRG1+	8,290	10,19	11,62	9,239	0,9341
CD8+ CD28- CD57+ KLRG1+	7,410	7,325	8,825	7,995	>0,9999

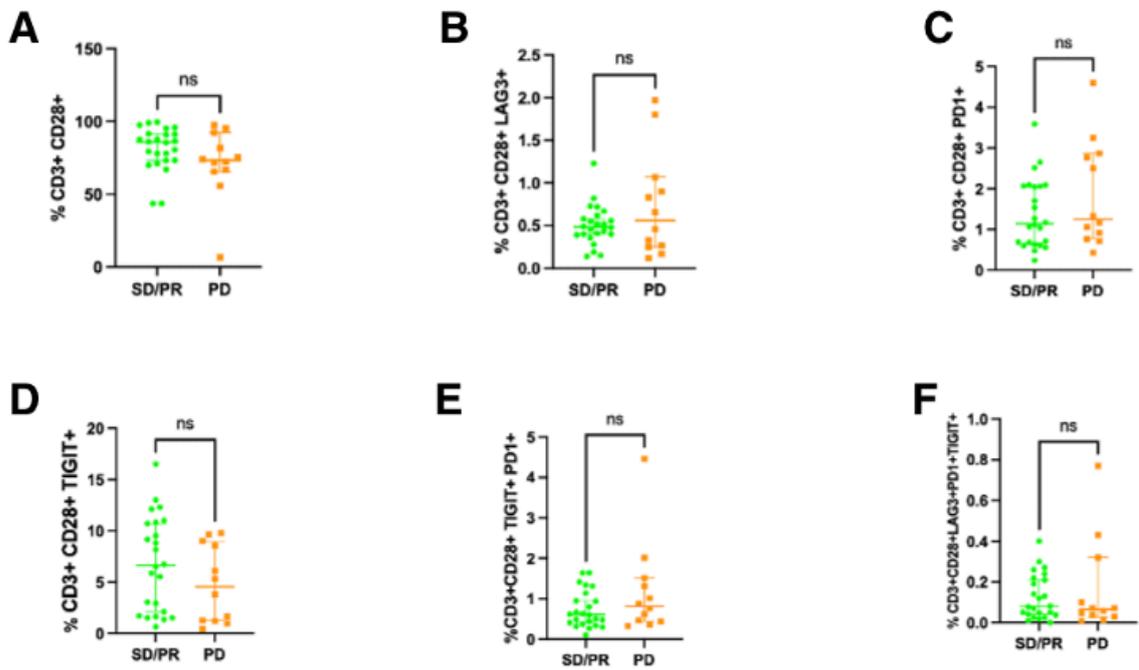


Figura 13 I grafici riportano il confronto delle frequenze dei linfociti T CD3+ exhausted-like ed esausti nel gruppo di pazienti SD/PR (n=24) e PD (n=12). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.7. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in t termini di frequenza di CD3+CD28+ (A), CD3+CD28+LAG3+ (B), CD3+CD28+PD1+ (C), CD3+CD28+TIGIT+ (D), CD3+CD28+TIGIT+PD1+ (E) e CD3+CD28+LAG3+PD1+TIGIT+ (F).

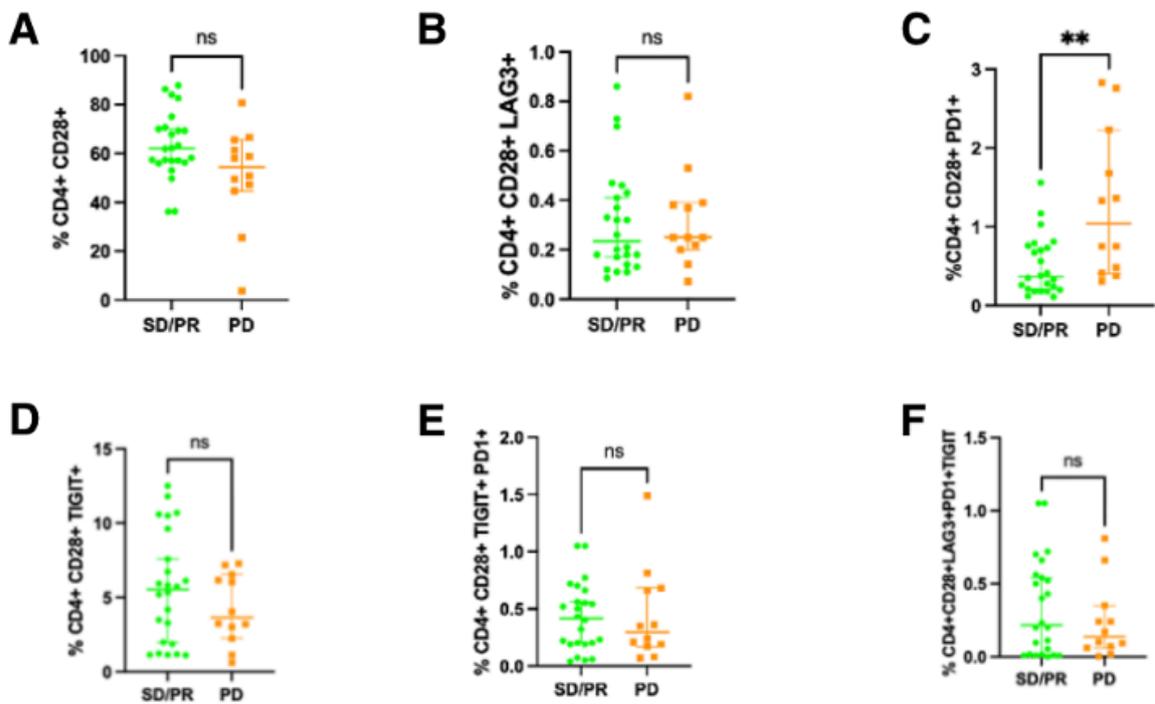


Figura 14 I grafici riportano il confronto delle frequenze dei linfociti T CD4+ exhausted-like ed esausti nel gruppo di pazienti SD/PR (n=24) e PD (n=12). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.7. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in te termini di frequenza) di CD4+CD28+ (A), CD4+CD28+LAG3+ (B), CD4+CD28+PD1+ (C), CD4+CD28+TIGIT+ (D), CD4+CD28+TIGIT+PD1+ (E) e CD4+CD28+LAG3+PD1+TIGIT+ (F).

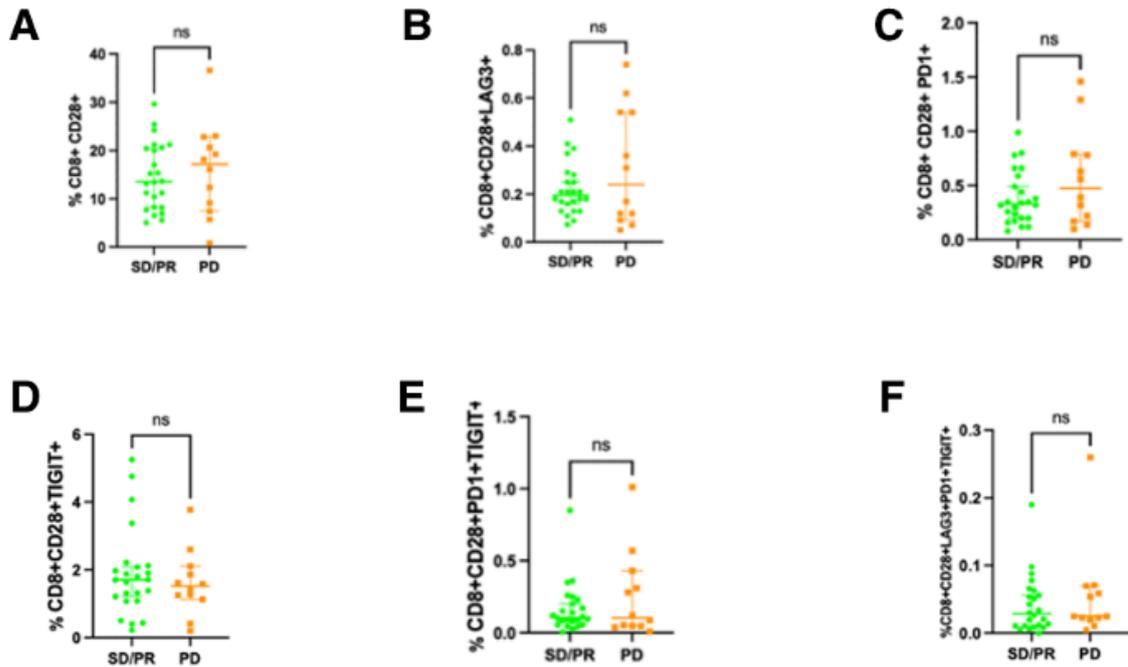


Figura 15 I grafici riportano il confronto delle frequenze dei linfociti T CD8+ exhausted-like ed esausti nel gruppo di pazienti SD/PR (n=24) e PD (n=12). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab. 7. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD8+CD28+ (A), CD8+CD28+LAG3+ (B), CD8+CD28+PD1+ (C), CD8+CD28+TIGIT+ (D), CD8+CD28+TIGIT+PD1+ (E) e CD8+CD28+LAG3+PD1+TIGIT+ (F).

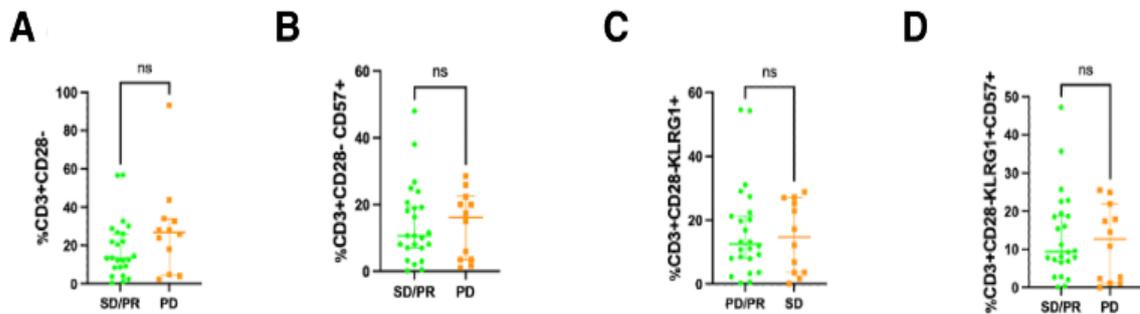


Figura 16 I grafici riportano la situazione dei linfociti T senescence-like e senescenti della famiglia dei CD3+ nel gruppo di pazienti SD/PR (n=24) e PD (n=12). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.7. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD3+CD28- (A), CD3+CD28-CD57+ (B), CD3+CD28-KLRG1+ (C) e CD3+CD28-KLRG1+CD57+ (D)

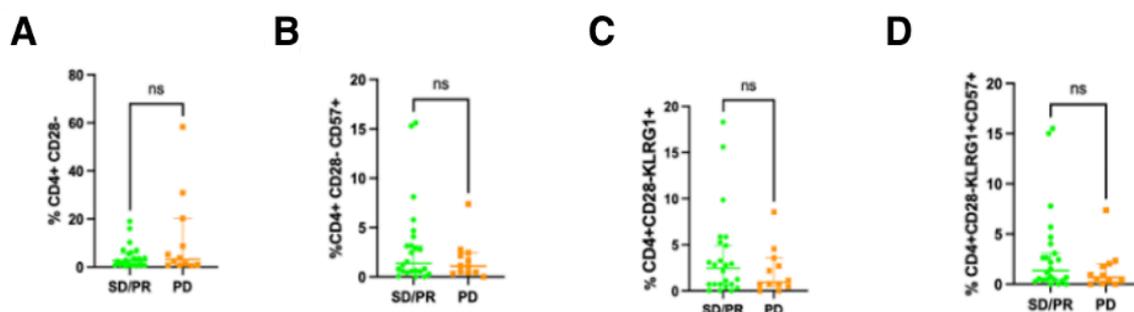


Figura 17 I grafici riportano la situazione dei linfociti T senescence-like e senescenti della famiglia dei CD4+ nel gruppo di pazienti SD/PR (n=24) e PD (n=12). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.7. I grafici riportano rispettivamente la percentuale ((%) in termini di frequenza di CD4+CD28- (A), CD4+CD28-CD57+ (B), CD4+CD28-KLRG1+ (C) e CD4+CD28-KLRG1+CD57+ (D)

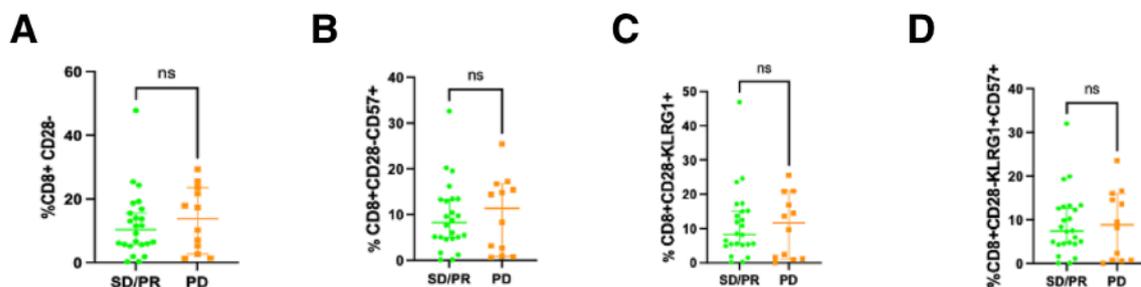


Figura 18 I grafici riportano la situazione dei linfociti T senescence-like e senescenti della famiglia dei CD8+ nel gruppo di pazienti SD/PR (n=24) e PD (n=12). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.7. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD8+CD28- (A), CD8+CD28-CD57+ (B), CD8+CD28-KLRG1+ (C) e CD8+CD28-KLRG1+CD57+ (D)

Come evidenziato in tabella precedente (Tab.7), abbiamo dimostrato che la sottopopolazione T *helper exhausted-like* CD4+CD28+PD1+ è significativamente più frequente nel gruppo di pazienti che svilupperanno progressione di malattia (Tab. 7, Fig. 14, $1,040 \pm 0,9231$, Mann-Whitney test, p-value= 0,0038).

Inoltre, anche se non statisticamente significativo, la % di linfociti CD4+CD28+, quindi con fenotipo “attivato”, sembra essere inferiore nel gruppo di pazienti che svilupperà PD rispetto a quelli con SD/PR (Tab. 7, Fig.14, $13,68 \pm 0,0656$, Mann-Whitney test, p-value= 0,0656).

Non abbiamo riscontrato significative differenze nei due gruppi di pazienti considerati per quanto riguarda le sottopopolazioni di linfociti T con fenotipo senescente.

4.2.b Associazione tra la frequenza di linfociti T esausti CD4+CD28+PD1+ e la progressione libera da malattia (PFS)

L'analisi delle sottopopolazioni T esauste e senescenti (paragrafo 1.11) ha evidenziato una differenza significativa tra le i due gruppi prognostici di pazienti per quanto riguarda la frequenza dei linfociti T CD4+CD28+PD1+. Per cui abbiamo quindi indagato se vi fosse associazione con la sopravvivenza, correlando la frequenza dei linfociti T CD4+CD28+PD1+ con la sopravvivenza libera da progressione (PFS).

I 33 pazienti analizzati sono stati suddivisi in 2 gruppi in base alla mediana della % di linfociti CD4+ CD28+ PD1+: "low" (n=23) e "high" (n=10).

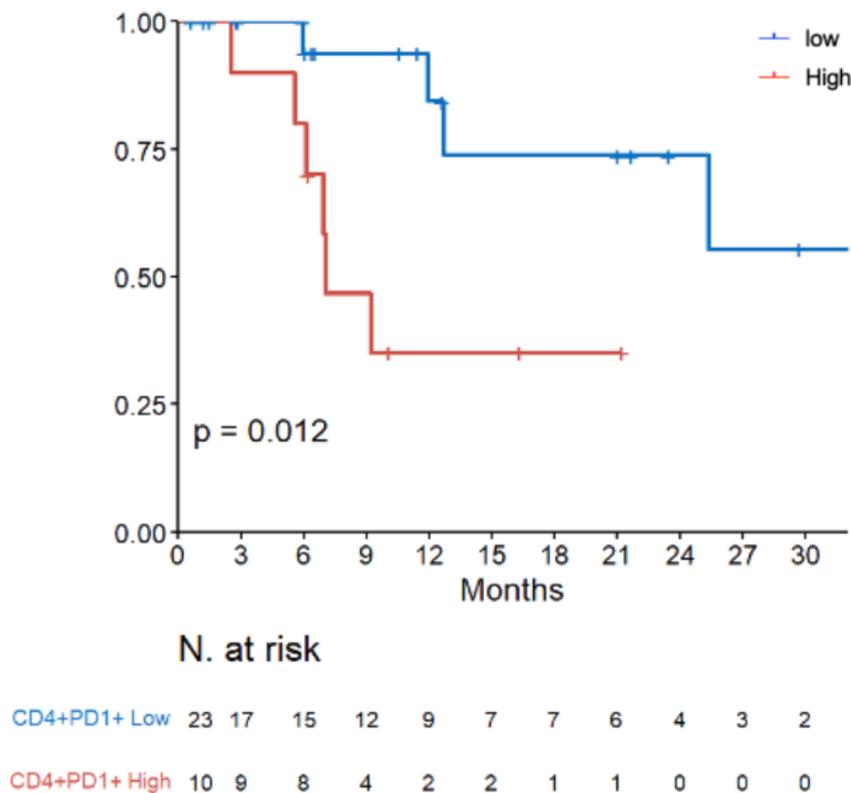


Figura 19 Curve di Kaplan-Meier in base all'espressione di CD4+ CD28+ PD1+ (low n=23, high n=10). Il grafico presenta sull'asse delle ascisse (X) il tempo misurato in mesi, a partire da 0 fino a 30 mesi, mentre sull'asse delle ordinate (Y) è riportata la probabilità di sopravvivenza, variabile da 0 a 1 (0-100%).

I pazienti che hanno una maggior frequenza di linfociti T helper "exhausted-like" CD4+CD28+PD1+ circolanti prima dell'inizio della terapia dimostrano una minor progressione libera da malattia (PFS) rispetto al gruppo con più bassa frequenza (Fig. 19, Kaplan-Meier, Cox analisi, HR: 1,16-3,66; $p = 0.012$).

4.3 Valutazione dell'espressione dei marcatori specifici di sottopopolazione dei linfociti T nei due sottogruppi di pazienti in termini di risposta alla terapia (SD/PR vs PD).

Abbiamo considerato l'espressione di LAG3, TIGIT e PD1 nei linfociti T esausti e di CD57 e KLRG1 in quelli senescenti in termini di Intensità Media di Fluorescenza (MFI) prima dell'inizio della terapia.

L'analisi è stata eseguita con lo scopo di vedere se vi fosse una correlazione tra i livelli di espressione dei marcatori di senescenza e di *exhaustion* nelle pazienti in PD e SD/PR prima dell'inizio della terapia.

In tabella (Tab.8) sono riportati i valori di mediana e deviazione standard (DS) delle MFI di ogni marcatore considerato per i due gruppi di pazienti (SD/PR e PD).

Tabella 8 Valori di mediana e deviazione standard (DS) delle diverse popolazioni di linfociti T esausti, exhausted like, senescenti e senescent-like nel gruppo di pazienti SD/PR (n=24) e PD (n=12) in base all'espressioni delle MFI.

MFI	Gruppo SD/PR		Gruppo PD		P-value
	Mediana	DS	Mediana	DS	
LAG3+ su CD3+ esausti	511,5	260,1	603,0	226,8	0,2477
PD1+ su CD3+ esausti	1091	770,4	990,0	1427	0,9281
TIGIT+ su CD3+ esausti	5077	3028	3713	5129	0,7283
LAG3+ su CD4+ esausti	293,5	220,1	425,0	448,1	0,4402
PD1+ su CD4+ esausti	720,0	1020	842,0	604,8	0,4760
TIGIT+ su CD4+ esausti	3871	2289	2167	4076	0,4163
LAG3+ su CD8+ esausti	334,0	201,8	610,0	456,5	0,0204
PD1+ su CD8+ esausti	695,0	619,1	1017	1024	0,4813
TIGIT+ su CD8+ esausti	3412	2318	2495	5680	>0,9999
KLRG1+ su CD3+ senescenti	2371	20241	1530	881,6	0,0016
CD57+ su CD3+ senescenti	31565	15204	25209	19778	0,5848
KLRG1+ su CD4+ senescenti	1566	679,9	1152	807,9	0,0955
CD57+ su CD4+ senescenti	37178	16329	28167	27184	0,3438
KLRG1+ sui CD8+ senescenti	1923	533,7	1505	813,2	0,2240
CD57+ su C84+ senescenti	28056	19727	23943	20830	0,5018

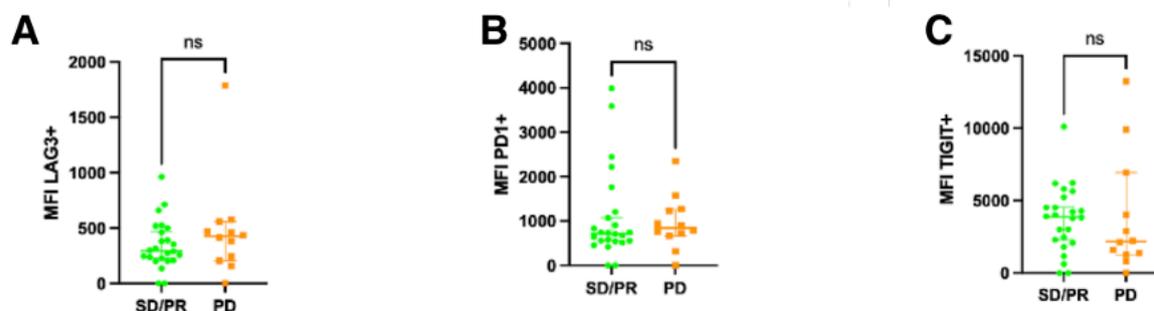


Figura 20 I grafici riportano l'espressione dell'MFI nel fenotipo dei linfociti T exhausted-like ed esausti dei CD3+ nel gruppo di pazienti SD/PR (n=24) e PD (n=12). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.8. I grafici riportano l'espressione di MFI dei linfociti CD3+ esausti con espressione di LAG3+ (A), PD1+ (B) e TIGIT+ (C).

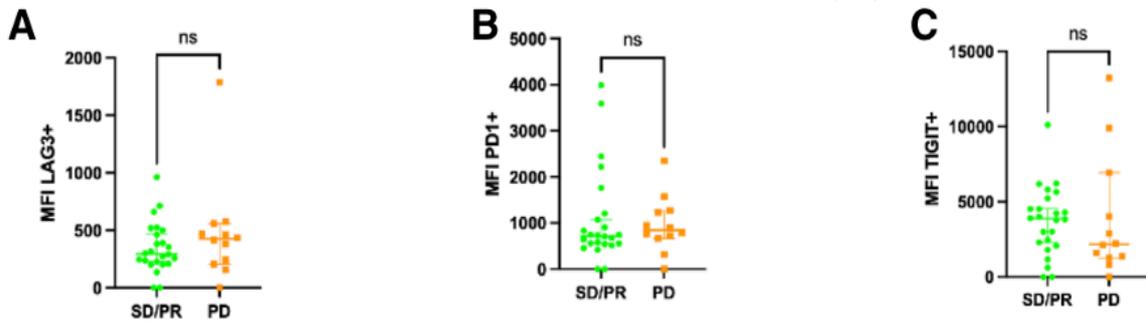


Figura 21 I grafici riportano l'espressione dell'MFI nel fenotipo dei linfociti T exhausted-like ed esausti dei CD4+ nel gruppo di pazienti SD/PR (n=24) e PD (n=12). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.8. I grafici riportano l'espressione di MFI dei linfociti CD4+ esausti con espressione di LAG3+ (A), PD1+ (B) e TIGIT+ (C).

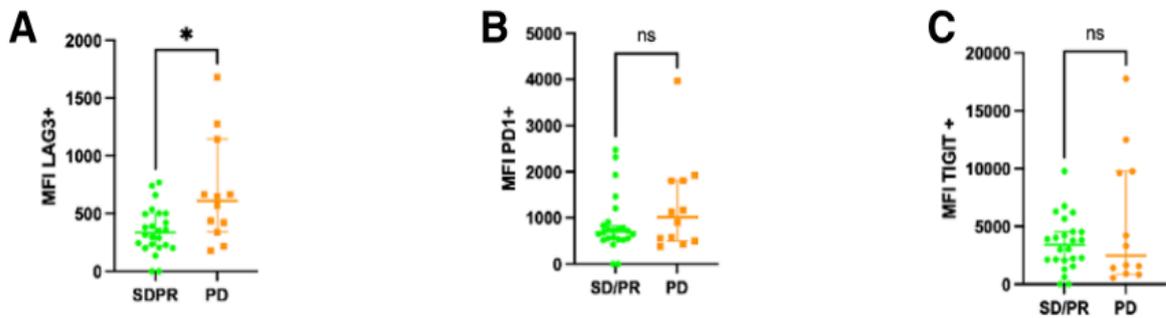


Figura 22 I grafici riportano l'espressione dell'MFI nel fenotipo dei linfociti T exhausted-like ed esausti dei CD8+ nel gruppo di pazienti SD/PR (n=24) e PD (n=12). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.8. I grafici riportano l'espressione di MFI dei linfociti CD8+ esausti con espressione di LAG3+ (A), PD1+ (B) e TIGIT+ (C).

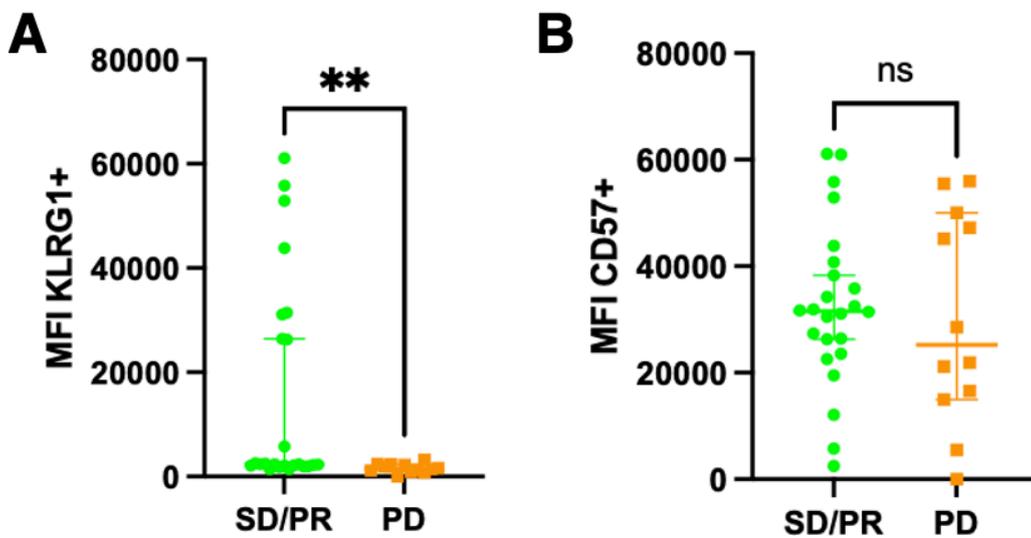


Figura 23 I grafici riportano l'espressione dell'MFI nel fenotipo dei linfociti T senescence-like e senescenti nella famiglia dei CD3+ nel gruppo SD/PR (n=24) e PD (n=12). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.8. I grafici riportano l'espressione di MFI dei linfociti CD3+ esausti con espressione di CD57+ (A) e KLRG1+(B).

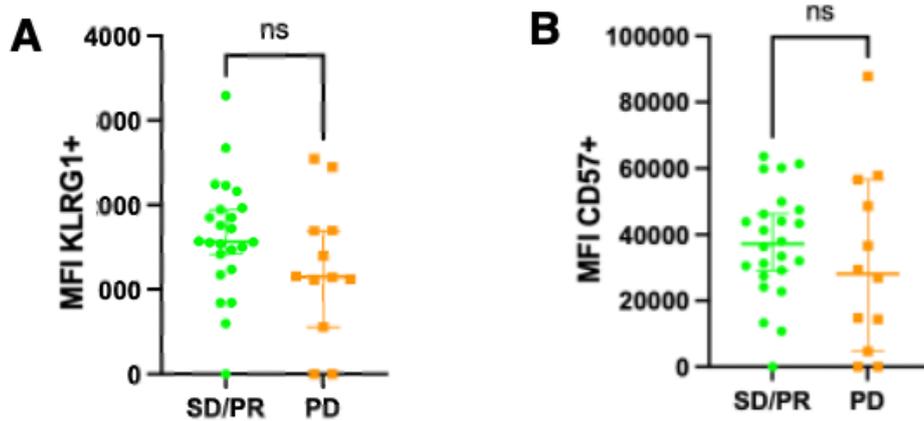


Figura 24 I grafici riportano l'espressione dell'MFI nel fenotipo dei linfociti T senescence-like e senescenti nella famiglia dei CD4+ nel gruppo SD/PR (n=24) e PD (n=12). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.8. I grafici riportano l'espressione di MFI dei linfociti

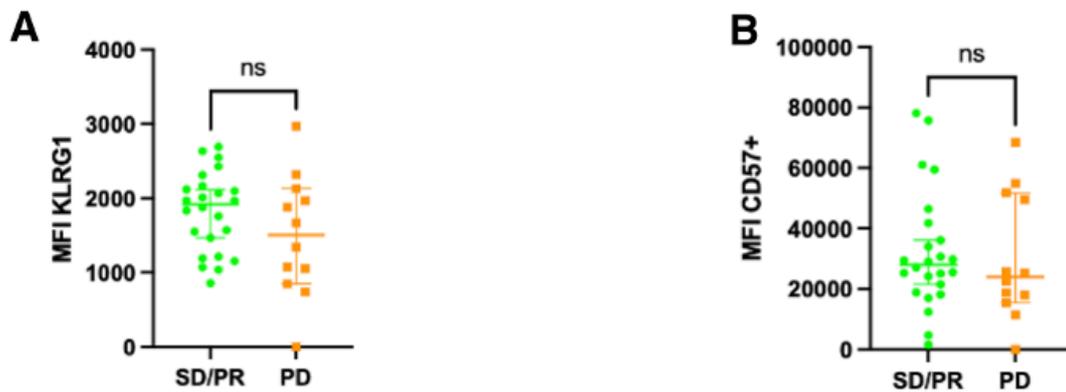


Figura 25 I grafici riportano l'espressione dell'MFI nel fenotipo dei linfociti T senescence-like e senescenti nella famiglia dei CD4+ nel gruppo SD/PR (n=24) e PD (n=12). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.8. I grafici riportano l'espressione di MFI dei linfociti CD8+ esausti con espressione di CD57+(A) e KLRG1+(B).

Come riportato in tabella precedente (Tab.8) si nota che l'espressione di LAG3+ nella sottopopolazione di linfociti T CD8+ è maggiore nel gruppo di pazienti che non ha risposto alla terapia rispetto a quelli che hanno risposto (PD vs SD/PR; Tab. 8, Fig. 22, $610,0 \pm 456,5$, Mann-Whitney test, $p = 0,0204$). Anche se non significativo, è possibile apprezzare un aumento dell'espressione di LAG3+ nella sottopopolazione di linfociti T esausti CD4+ nelle pazienti in PD rispetto a quelle con SD/PR (Tab. 8, Fig. 21, $424,0 \pm 448,1$, Mann-Whitney test, $p = 0,4402$). Tali risultati sembrano suggerire che i livelli di espressione di LAG3+ nelle sottopopolazioni di T esausti possano essere associati alla risposta alla terapia. Inoltre, abbiamo dimostrato che nei pazienti che rispondono alla terapia o che hanno una risposta parziale, i livelli di espressione di KLRG1 nel totale dei linfociti T CD3+ è maggiore rispetto al gruppo di pazienti che ha avuto progressione (Tab. 8, Fig. 23, 2371 ± 20241 , Mann-Whitney test, $p\text{-value} = 0,0016$), suggerendo un'associazione tra i livelli di espressione di KLRG1 e la risposta alla terapia.

4.3.a Associazione tra l'espressione di linfociti T CD8+ positivi a LAG3 e la progressione libera da malattia (PFS)

Alla luce dei risultati ottenuti nella precedente analisi, abbiamo valutato se i livelli di espressione di LAG3+ sui linfociti CD8+ fossero associati alla sopravvivenza in termini di sopravvivenza libera da progressione (PFS). A tal scopo abbiamo suddiviso i 33 pazienti in base alla mediana di espressione di LAG3+ sui linfociti CD8+ (mediana= 456) in due gruppi: "low" (n=18) e "high" (n=18).

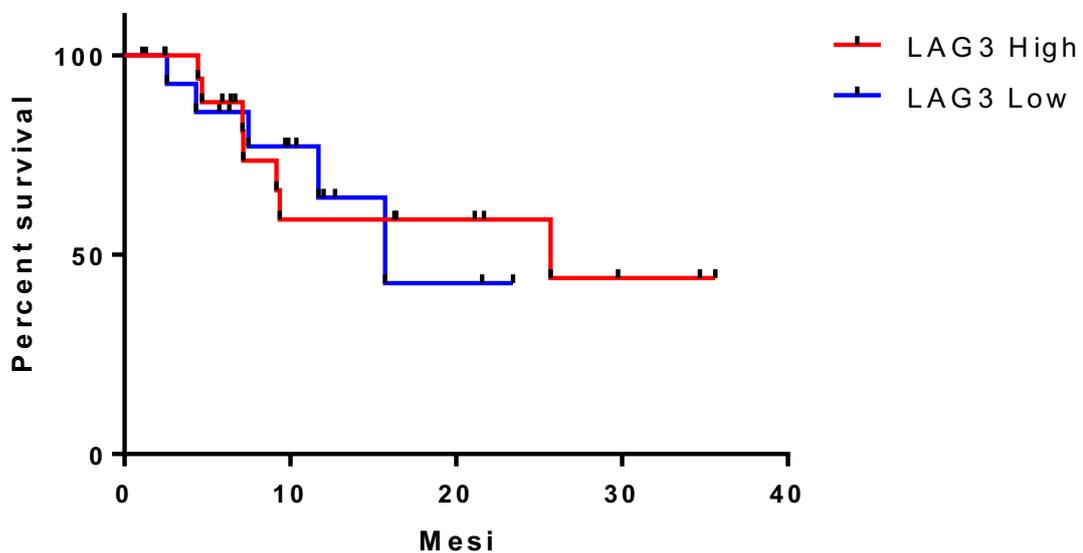


Figura 26 Curve di Kaplan-Meier in base all'espressione di CD8+ CD28+ LAG3+ (low n=18, high n=18). Il grafico presenta sull'asse delle ascisse (X) il tempo misurato in mesi, mentre sull'asse delle ordinate (Y) è riportata la probabilità di sopravvivenza,

L'analisi non ha evidenziato alcuna relazione significativa in termini di probabilità di sopravvivenza libera da progressione (HR:0,94 - 1,05; Kaplan-Meier, Cox analisi; p=0,91).

4.3.b Associazione tra l'espressione di linfociti T CD3+ positivi a KLRG1+ e la progressione libera da malattia (PFS)

Considerati i risultati precedentemente ottenuti (paragrafo 4.3), abbiamo valutato se l'espressione di KLRG1+ sui linfociti CD3+CD28-KLRG1+ fosse associata alla sopravvivenza in termini di sopravvivenza libera da progressione (PFS).

I 33 pazienti dello studio sono suddivisi in 2 gruppi ("high" n=18 e "low" n=18) in base alla mediana di espressione di KLRG1+ sui linfociti CD3+ (mediana= 1933).

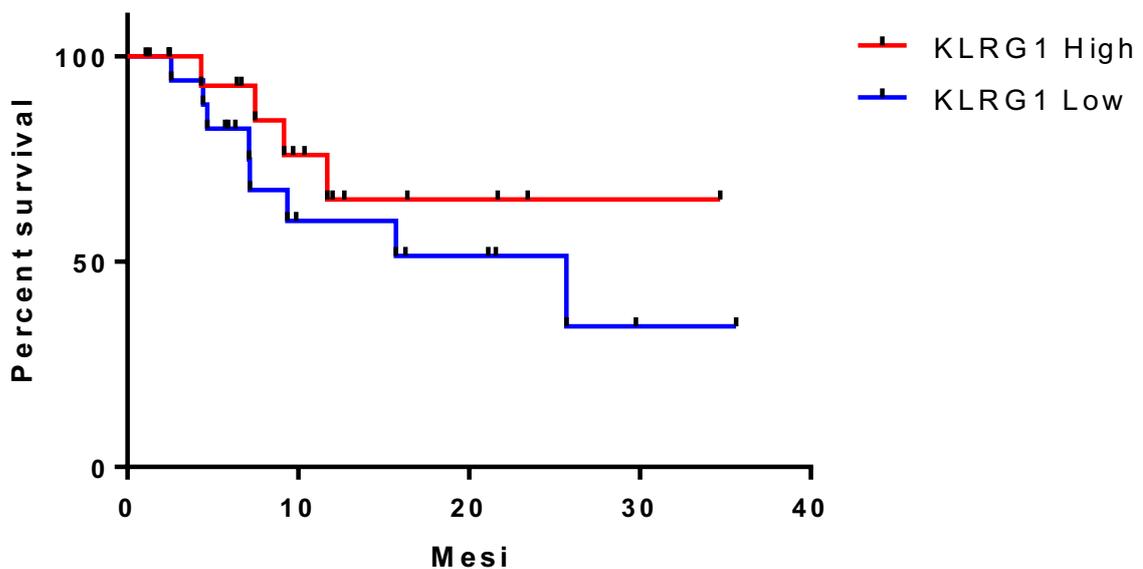


Figura 27 Curve di Kaplan-Meier in base all'espressione di CD3+ CD28- KLRG1+ (low n=18, high n=18). Il grafico presenta sull'asse delle ascisse (X) il tempo misurato in mesi, mentre sull'asse delle ordinate (Y) è riportata la probabilità di sopravvivenza,

L'analisi non ha evidenziato alcuna relazione significativa in termini di probabilità di sopravvivenza libera da progressione (HR: 0,58-1,71; Kaplan-Meier; Cox analisi, $p=0.35$).

4.4 Valutazione della frequenza di linfociti T senescenti e T esausti circolanti in base alla sede di metastasi

Al fine di valutare l'eventuale presenza di una relazione tra l'espressione di linfociti T senescenti ed esausti e la sede di metastasi, abbiamo suddiviso i 36 pazienti in due gruppi: un gruppo che comprende 22 pazienti in cui sono state diagnosticate metastasi viscerali (viscerali) e uno con 12 pazienti in cui sono state diagnosticate metastasi ossee o nei tessuti molli (non viscerali).

In tabella (Tab.9) sono riportati i valori di mediana e deviazione standard (DS) delle sottopopolazioni di linfociti T circolanti analizzati per i due gruppi di pazienti (metastasi viscerali e non).

Tabella 9 Valori di mediana e deviazione standard (DS) delle diverse popolazioni di linfociti T esausti, exhausted like, senescenti e senescent-like nel gruppo di pazienti viscerali (n=22) e non viscerali (n=12) in base alla localizzazione metastatica.

Popolazione	Viscerali		Non viscerali		P-value
	Mediana	DS	Mediana	DS	
CD3+ CD28+	76,60	15,95	87,60	22,95	0,1778
CD3+ CD28+ LAG3+	0,4850	0,3970	0,4900	0,4450	0,9553
CD3+ CD28+ PD1+	1,220	1,165	1,120	0,7349	0,4653
CD3+ CD28+ TIGIT+	6,305	4,369	4,115	4,494	0,5370
CD3+ CD28+ PD1+ TIGIT+	0,7000	0,8928	0,5600	0,5370	0,3071
CD3+ CD28+ PD1+ LAG3+ TIGIT+	0,07500	0,1741	0,07100	0,1362	0,8539
CD4+ CD28+	57,40	15,40	66,70	19,45	0,1481
CD4+ CD28+ LAG3+	0,2850	0,1995	0,2350	0,2202	0,7915
CD4+ CD28+ PD1+	0,7550	0,7400	0,7400	0,3663	0,3227
CD4+ CD28+ TIGIT+	5,530	3,333	3,140	3,359	0,2702
CD4+ CD28+ PD1+ TIGIT+	0,3800	0,3462	0,2250	0,3091	0,2428
CD4+ CD28+ PD1+ LAG3+ TIGIT+	0,04450	0,07007	0,06550	0,06587	0,9298
CD8+ CD28+	14,20	7,800	14,40	8,146	0,8539
CD8+ CD28+ LAG3+	0,2100	0,1933	0,1750	0,1086	0,3633
CD8+ CD28+ PD1+	0,3850	0,3754	0,3100	0,2038	0,1303
CD8+ CD28+ TIGIT+	1,755	1,253	1,280	1,004	0,1243
CD8+ CD28+ PD1+ TIGIT+	0,1150	0,2544	0,07600	0,1597	0,1726
CD8+ CD28+ PD1+ LAG3+ TIGIT+	0,02850	0,06182	0,02050	0,02775	0,1389
CD3+ CD28-	23,05	15,97	12,30	23,17	0,1391
CD3+ CD28- CD57+	17,75	12,51	8,085	7,261	0,1941
CD3+ CD28- KLRG1+	18,40	15,06	9,580	8,302	0,0840
CD3+ CD28- CD57+ KLRG1+	15,70	12,12	7,635	7,288	0,1243
CD4+ CD28-	2,605	8,200	2,750	14,97	0,8666
CD4+ CD28- CD57+	0,9200	4,526	1,345	1,963	0,6194
CD4+ CD28- KLRG1+	1,640	4,969	1,725	2,501	0,9936
CD4+ CD28- CD57+ KLRG1+	0,7750	4,504	1,340	1,991	0,7916
CD8+ CD28-	13,35	11,51	6,270	6,528	0,1346
CD8+ CD28- CD57+	10,06	8,616	5,100	5,433	0,2429
CD8+ CD28- KLRG1+	12,20	11,06	5,505	6,128	0,1243
CD8+ CD28- CD57+ KLRG1+	9,675	8,266	4,850	5,509	0,1914

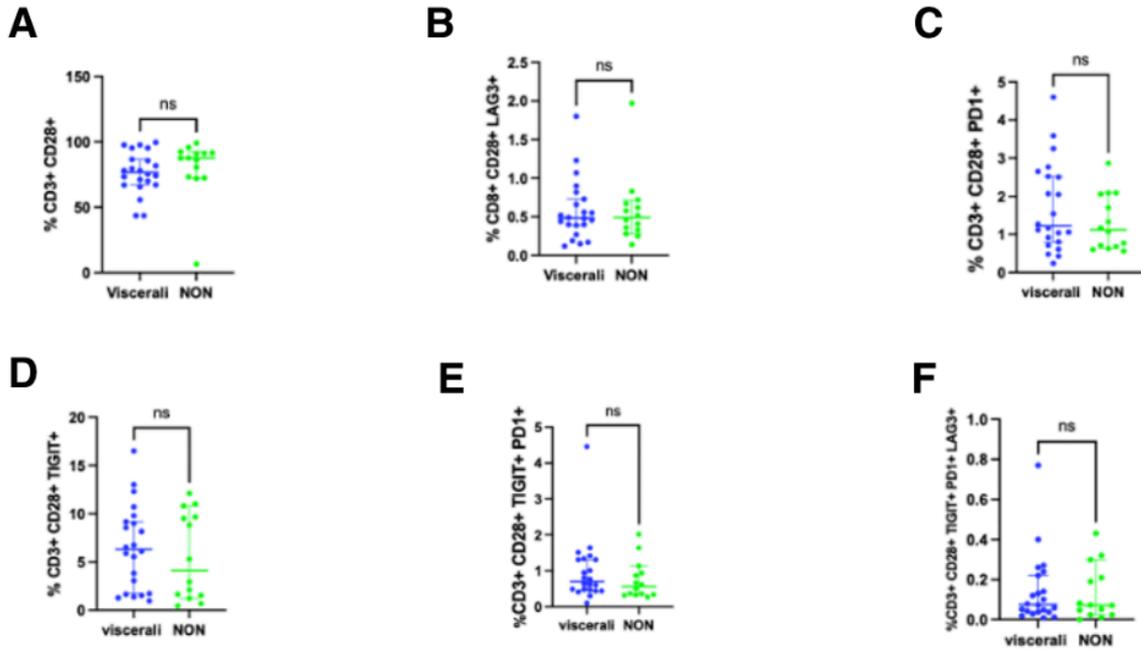


Figura 28 I grafici riportano il fenotipo dei linfociti T exhausted-like ed esausti della famiglia dei CD3+ nel confronto metastasi viscerali (n=22) vs. non viscerali (n=14). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.9. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD3+CD28+ (A), CD3+CD28+LAG3+ (B), CD3+CD28+PD1+ (C), CD3+CD28+TIGIT+ (D), CD3+CD28+TIGIT+PD1+ (E) e CD3+CD28+LAG3+PD1+TIGIT+ (F) nei pazienti con metastasi viscerali e non.

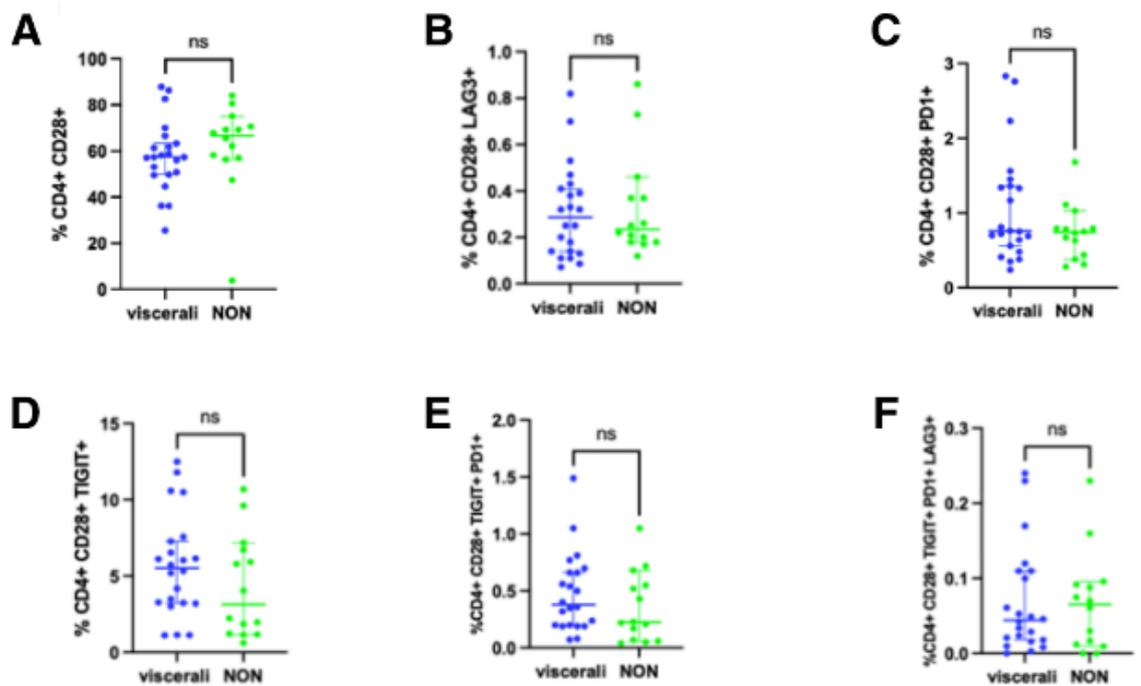


Figura 29 I grafici riportano il fenotipo dei linfociti T exhausted-like ed esausti della famiglia dei CD4+ nel confronto metastasi viscerali (n=22) vs. non viscerali (n=14). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.9. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD4+CD28+ (A), CD4+CD28+LAG3+ (B), CD4+CD28+PD1+ (C), CD4+CD28+TIGIT+ (D), CD4+CD28+TIGIT+PD1+ (E) e CD4+CD28+LAG3+PD1+TIGIT+ (F) nei pazienti con metastasi viscerali e non.

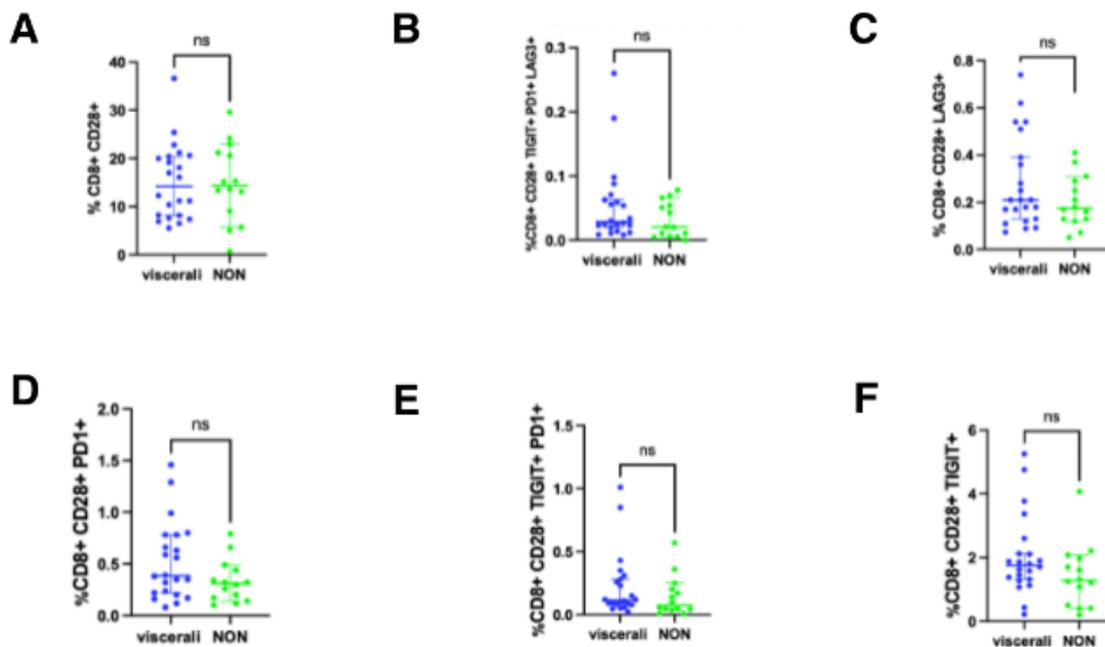


Figura 30 I grafici riportano il fenotipo dei linfociti T exhausted-like ed esausti della famiglia dei CD8+ nel confronto metastasi viscerali (n=22) vs. non viscerali (n=14). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.9. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD8+CD28+ (A), CD8+CD28+LAG3+ (B), CD8+CD28+PD1+ (C), CD8+CD28+TIGIT+ (D), CD8+CD28+TIGIT+PD1+ (E) e CD8+CD28+LAG3+PD1+TIGIT+ (F) nei pazienti con metastasi viscerali e non.

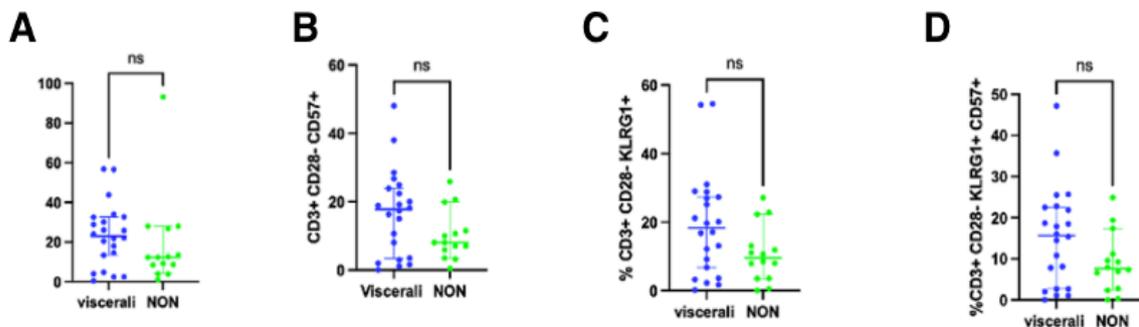


Figura 31 I grafici riportano il fenotipo dei linfociti T senescence-like e senescente della famiglia dei CD3+ nel confronto metastasi viscerali (n=22) vs. non viscerali (n=14). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.9. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD3+CD28- (A), CD3+CD28-CD57+ (B), CD3+CD28-KLRG1+ (C) e CD3+CD28-KLRG1+CD57+ (D) nei pazienti con metastasi viscerali e non.

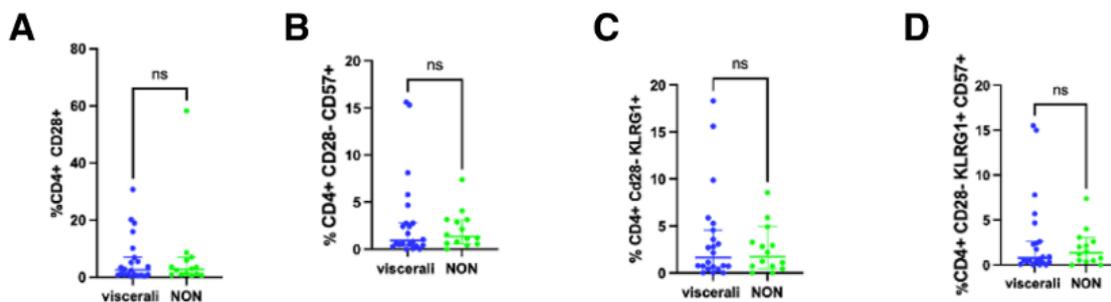


Figura 32 I grafici riportano il fenotipo dei linfociti T senescence-like e senescente della famiglia dei CD4+ nel confronto metastasi viscerali (n=22) vs. non viscerali (n=14). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.9. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD4+CD28- (A), CD4+CD28-CD57+ (B), CD4+CD28-KLRG1+ (C) e CD4+CD28-KLRG1+CD57+ (D) nei pazienti con metastasi viscerali e non.

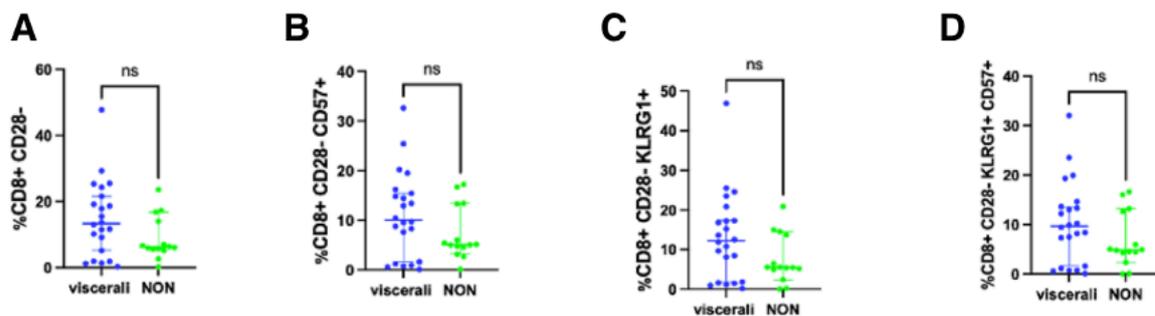


Figura 33 I grafici riportano il fenotipo dei linfociti T senescente-like e senescente della famiglia dei CD8+ nel confronto metastasi viscerali (n=22) vs. non viscerali (n=14). I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.9. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD8+CD28- (A), CD8+CD28-CD57+ (B), CD8+CD28-KLRG1+ (C) e CD8+CD28-KLRG1+CD57+ (D) nei pazienti con metastasi viscerali e non.

Non abbiamo evidenziato alcuna significativa differenza nei due gruppi di pazienti, suggerendo che la distribuzione delle sottopopolazioni di linfociti T senescenti ed esauste è indipendente dalla sede di metastasi. Tuttavia, è apprezzabile un aumento dei linfociti T *senescent-like* CD3+CD28-CD57+, seppur non significativo, nel gruppo di pazienti che hanno metastasi non viscerali (Tab. 9, Fig. 31, media±DS: 0,9200 ± 4,526, Mann-Whitney test, $p= 0,6194$).

4.5 Valutazione della % di linfociti T senescenti e T esausti circolanti in base al marcatore di proliferazione Ki-67

Il Ki-67 è un marcatore di proliferazione cellulare utilizzato nella diagnosi e nella gestione del tumore al seno. La sua funzione principale è quella di indicare la percentuale di cellule tumorali che sono in fase attiva di divisione (proliferazione).

Un'alta proliferazione tumorale associata a un elevato numero di linfociti T senescenti o esausti potrebbe contribuire a una ridotta efficacia della risposta immunitaria contro il tumore, potenzialmente peggiorando la prognosi e complicando il trattamento.

Per comprendere se ci sia un'associazione tra la frequenza dei linfociti T esausti e senescenti e l'indice di proliferazione cellulare, abbiamo suddiviso i nostri pazienti secondo il tasso di Ki-67, precedentemente descritto (paragrafo 1.11). Abbiamo incluso nello studio 36 pazienti così suddivisi: 10 con un basso livello di Ki-67 ($\leq 14\%$, *low*), 5 con un livello intermedio ($15\% < x \leq 20\%$, *intermediate*) e 14 con un livello elevato ($> 20\%$, *high*).

In tabella (Tab.10) sono riportati i valori di mediana e deviazione standard (DS) delle sottopopolazioni di linfociti T circolanti analizzati per i tre gruppi di *range* del tasso di Ki-67. ⁵¹

Tabella 10 Confronto tra il tasso di Ki-67 (basso n=10, intermedio n=5, alto n=14) mediante il fenotipo dei linfociti T senescenti ed esausti

Popolazione	Low		Intermediate		High		p-value
	Mediana	DS	Mediana	DS	Mediana	DS	
CD3+ CD28+	86,75	26,73	80,50	16,74	76,60	14,51	0,8755
CD3+ CD28+ LAG3+	0,4100	0,3137	0,6200	0,1671	0,5200	0,4318	0,7497
CD3+ CD28+ PD1+	0,7400	0,8889	2,060	0,8806	1,220	1,166	0,2044
CD3+ CD28+ TIGIT+	5,125	4,875	2,110	4,712	5,705	4,367	0,8295
CD3+ CD28+ PD1+ TIGIT+	0,5700	0,4953	1,010	0,4698	0,6950	1,053	0,4909
CD3+ CD28+ PD1+ LAG3+TIGIT+	0,05850	0,1247	0,02400	0,1241	0,09900	0,2065	0,4221
CD4+ CD28+	66,70	23,21	57,00	6,025	58,55	16,11	0,5067
CD4+ CD28+ LAG3+	0,2950	0,2452	0,2600	0,2600	0,2850	0,1858	0,6026
CD4+ CD28+ PD1+	0,6800	0,3939	1,110	0,8174	0,7650	0,7013	0,0769
CD4+ CD28+ TIGIT+	4,415	3,668	1,980	2,952	4,690	3,198	0,8342
CD4+ CD28+ PD1+ TIGIT+	0,2000	0,3182	0,5200	0,2887	0,4650	0,3638	0,2953
CD4+ CD28+ PD1+ LAG3+ TIGIT+	0,05200	0,06437	0,01200	0,05725	0,05100	0,08181	0,6808
CD8+ CD28+	13,35	10,10	20,60	3,453	12,85	7,140	0,1172
CD8+ CD28+ LAG3+	0,1500	0,1977	0,3700	0,1601	0,2100	0,1469	0,0164
CD8+ CD28+ PD1+	0,2900	0,4217	0,5600	0,1803	0,3450	0,3062	0,2824
CD8+ CD28+ TIGIT+	1,440	0,7636	1,700	1,126	1,655	1,275	0,3880
CD8+ CD28+ PD1+ TIGIT+	0,07450	0,09959	0,1200	0,1273	0,1300	0,3062	0,3513
CD8+ CD28+ PD1+ LAG3+ TIGIT+	0,02300	0,02328	0,02000	0,03323	0,02750	0,07528	0,6958
CD3+ CD28-	12,90	26,92	12,50	16,92	23,05	14,47	0,8184
CD3+ CD28- CD57+	7,555	9,151	3,450	7,993	17,75	10,04	0,1455
CD3+ CD28- KLRG1+	9,780	9,431	6,780	7,845	16,95	14,04	0,2272
CD3+ CD28- CD57+ KLRG1+	7,360	8,981	2,800	7,764	15,25	9,682	0,1860
CD4+ CD28-	2,750	17,58	3,510	7,966	1,020	8,561	0,4743
CD4+ CD28- CD57+	1,345	2,107	1,030	1,607	0,7150	4,294	0,8465
CD4+ CD28- KLRG1+	2,175	2,683	1,120	1,868	0,7550	4,506	0,8504
CD4+ CD28- CD57+ KLRG1+	1,340	2,155	0,8800	1,684	0,5750	4,237	0,9206
CD8+ CD28-	6,410	8,402	6,410	6,455	11,60	12,15	0,4029
CD8+ CD28- CD57+	4,915	7,587	5,460	6,350	9,985	8,040	0,3515
CD8+ CD28- KLRG1+	5,510	7,657	5,560	6,635	10,22	11,56	0,3770
CD8+ CD28- CD57+ KLRG1+	4,795	7,329	4,930	6,177	8,825	7,722	0,4485

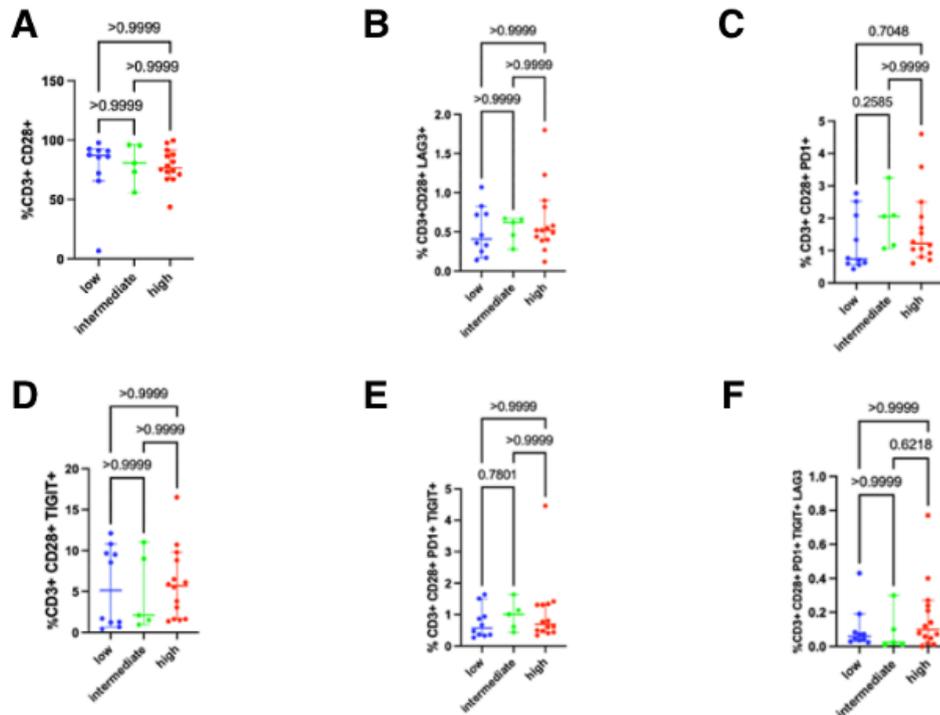


Figura 34 I grafici riportano il tasso di Ki-67 (basso n=10, intermedio n=5, alto n=14) in relazione ai linfociti T exhausted-like ed esausti della famiglia dei CD3+. I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.10. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD3+CD28+ (A), CD3+CD28+LAG3+ (B), CD3+CD28+PD1+ (C), CD3+CD28+TIGIT+ (D), CD3+CD28+TIGIT+PD1+ (E) e CD3+CD28+LAG3+PD1+TIGIT+ (F) in base al tasso di Ki-67%.

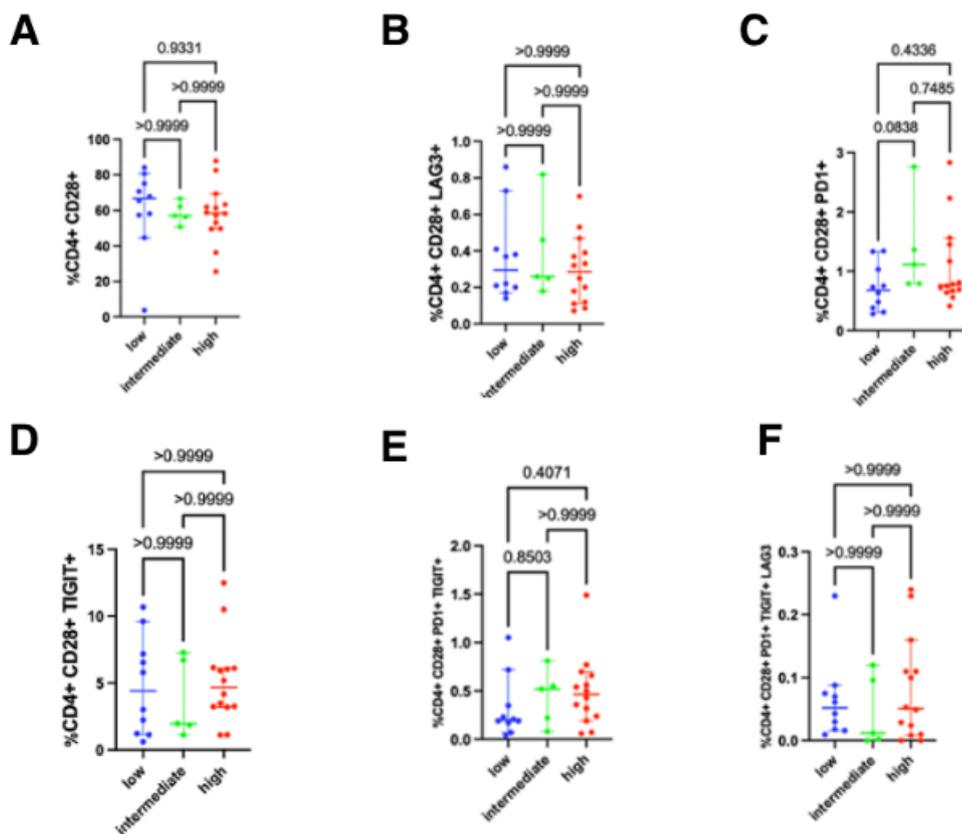


Figura 35 I grafici riportano il tasso di Ki-67 (basso n=10, intermedio n=5, alto n=14) in relazione ai linfociti T exhausted-like ed esausti della famiglia dei CD4+. I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.10. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD4+CD28+ (A), CD4+CD28+LAG3+ (B), CD4+CD28+PD1+ (C), CD4+CD28+TIGIT+ (D), CD4+CD28+TIGIT+PD1+ (E) e CD4+CD28+LAG3+PD1+TIGIT+ (F) in base al tasso di Ki-67%.

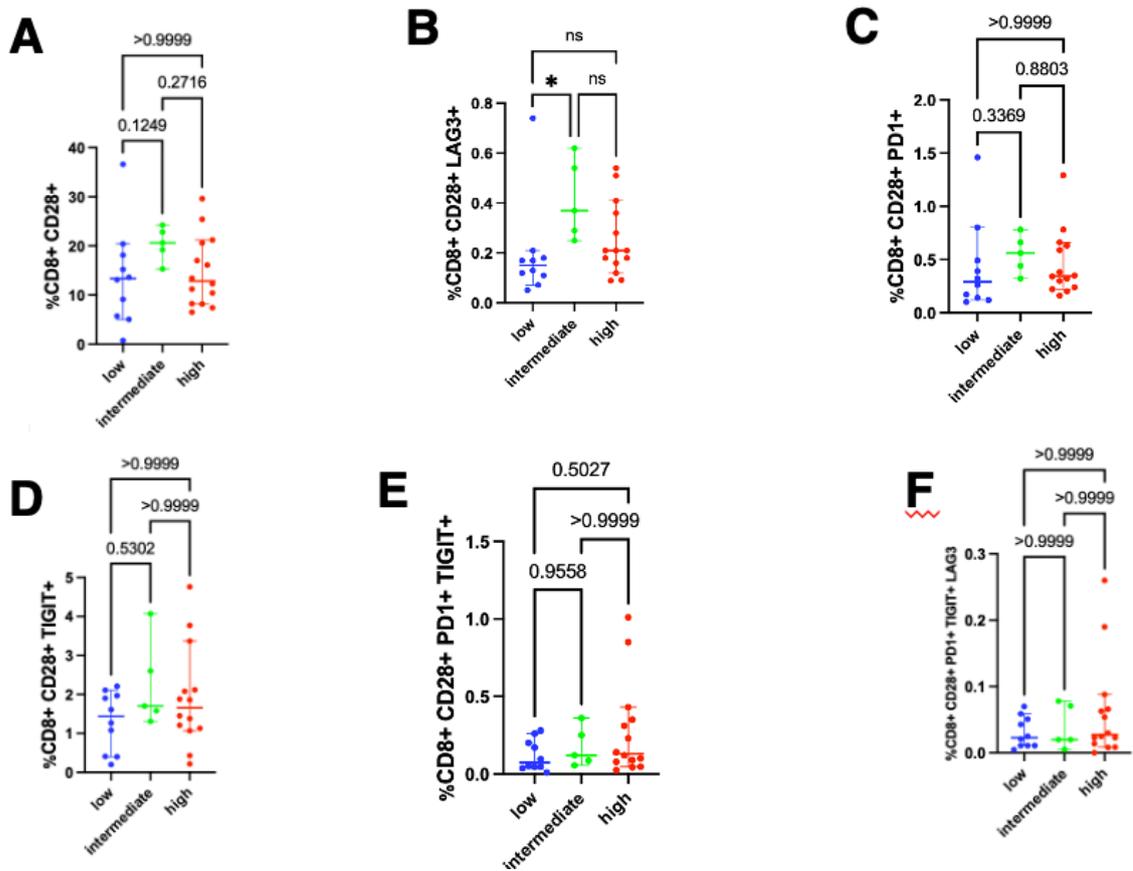


Figura 36 I grafici riportano il tasso di Ki-67 (basso n=10, intermedio n=5, alto n=14) in relazione ai linfociti T exhausted-like e esausti della famiglia dei CD8+. I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.10. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD8+CD28+ (A), CD8+CD28+LAG3+ (B), CD8+CD28+PD1+ (C), CD8+CD28+TIGIT+ (D), CD8+CD28+TIGIT+PD1+ (E) e CD8+CD28+LAG3+PD1+TIGIT+ (F) in base al tasso di Ki-67%.

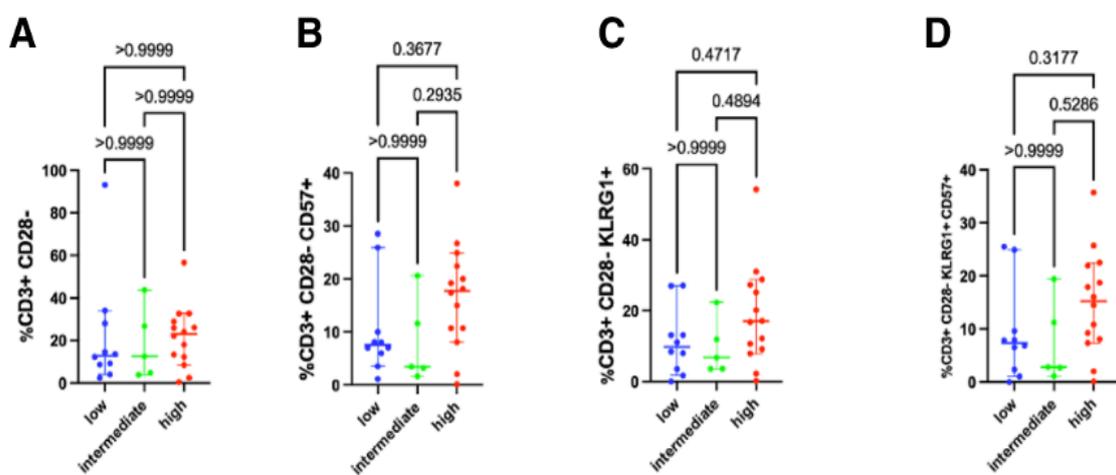


Figura 37 I grafici riportano il tasso di Ki-67 (basso n=10, intermedio n=5, alto n=14) in relazione ai linfociti T senescence-like e senescenti della famiglia dei CD3+. I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.10. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD3+CD28- (A), CD3+CD28-CD57+ (B), CD3+CD28-KLRG1+ (C) e CD3+CD28-KLRG1+CD57+ (D) in base al tasso di Ki-67%.

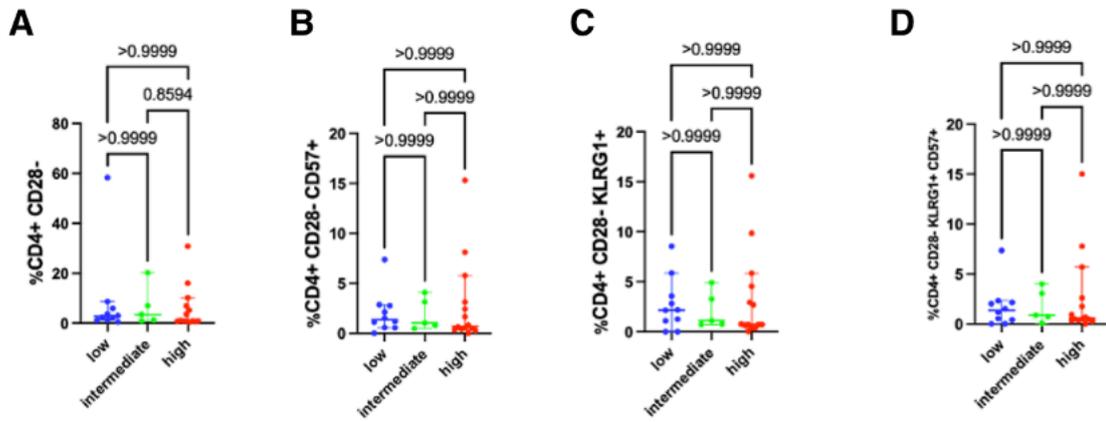


Figura 38 I grafici riportano il tasso di Ki-67 (basso n=10, intermedio n=5, alto n=14) in relazione ai linfociti T senescence-like e senescenti della famiglia dei CD4+. I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.10. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD4+CD28- (A), CD4+CD28-CD57+ (B), CD4+CD28-KLRG1+ (C) e CD4+CD28-KLRG1+CD57+ (D) in base al tasso di Ki-67%.

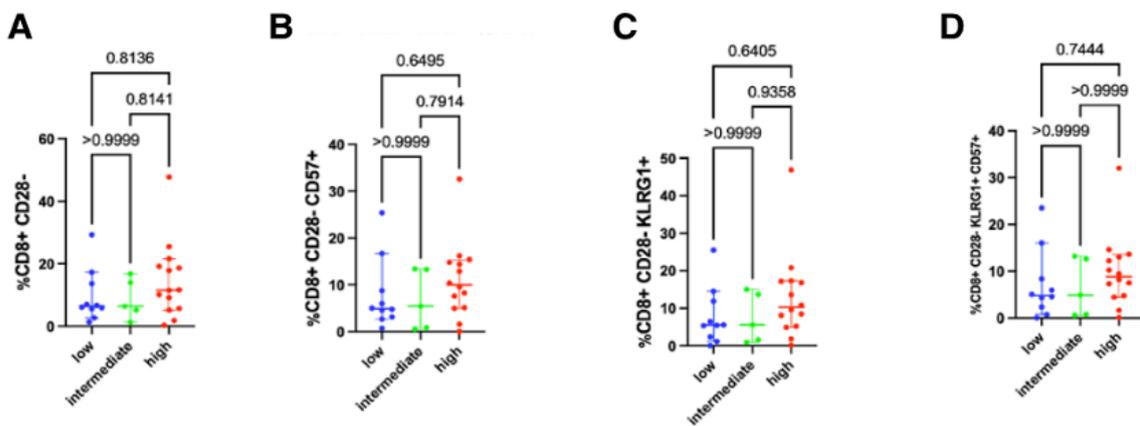


Figura 39 I grafici riportano il tasso di Ki-67 (basso n=10, intermedio n=5, alto n=14) in relazione ai linfociti T senescence-like e senescenti della famiglia dei CD8+. I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.10. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD8+CD28- (A), CD8+CD28-CD57+ (B), CD8+CD28-KLRG1+ (C) e CD8+CD28-KLRG1+CD57+ (D) in base al tasso di Ki-67%.

Dall'analisi si evidenzia una maggior frequenza di cellule CD8+CD28+LAG3+ (*exhausted-like*) nel gruppo di pazienti *intermediate* rispetto a quello *low* (Tab. 10, Fig. 36, $0,6200 \pm 0,1671$, Kruskal-Wallis test, $p = 0,0164$). Inoltre, si apprezza un aumento della popolazione CD4+CD28+PD1+ (*exhausted-like*), anche se non significativo, sempre nel gruppo di pazienti *intermediate* (Tab. 10, Fig. 35, $1,110 \pm 0,3939$, Kruskal-Wallis test, $p = 0,0769$).

4.6 Confronto dell'espressione di HER-2 nelle pazienti tramite l'analisi dei linfociti T senescenti ed esausti

HER2 è una proteina che svolge un ruolo fondamentale nella crescita e nella divisione cellulare. Prodotto dal gene *HER2*, agisce come recettore sulla superficie delle cellule ed è coinvolto principalmente nei processi di segnalazione cellulare per la crescita e la riparazione. Nel tumore alla mammella la sua sovraespressione è associata a un comportamento più aggressivo del tumore e a un tasso di crescita più rapido.

Al fine di capire se vi fosse una relazione tra i pazienti con espressione di HER2 e sottopopolazioni di linfociti T senescenti ed esausti circolanti, abbiamo suddiviso i pazienti in due gruppi in base alla presenza (*positive*, n=18) o assenza (*negative*, n=18) di HER2.

In tabella (Tab.11) sono riportati i valori di mediana e deviazione standard (DS) delle sottopopolazioni di linfociti T circolanti analizzati nei due gruppi di pazienti.

Tabella 11 mediane e deviazioni standard (DS) delle sottopopolazioni di linfociti T esausti e senescenti nei due gruppi di pazienti "negative" e "low/neg".

Popolazione	Positive		Negative		p-value
	Mediana	DS	Mediana	DS	
CD3+ CD28+	83,60	23,00	77,95	14,00	0,7846
CD3+ CD28+ LAG3+	0,6650	0,4656	0,3950	0,2627	0,0038
CD3+ CD28+ PD1+	1,435	1,126	1,095	0,9037	0,2231
CD3+ CD28+ TIGIT+	2,315	4,340	8,350	4,047	0,0581
CD3+ CD28+ PD1+ TIGIT+	0,9050	0,9851	0,5500	0,3503	0,0672
CD3+ CD28+ PD1+ LAG3+ TIGIT+	0,08000	0,1930	0,06050	0,1132	0,3348
CD4+ CD28+	60,15	19,36	57,75	14,71	0,8087
CD4+ CD28+ LAG3+	0,2850	0,2066	0,2300	0,2081	0,5467
CD4+ CD28+ PD1+	0,9050	0,7644	0,6850	0,3846	0,0722
CD4+ CD28+ TIGIT+	3,240	3,409	5,870	3,229	0,1494
CD4+ CD28+ PD1+ TIGIT+	0,2850	0,3889	0,3750	0,2782	0,5159
CD4+ CD28+ PD1+ LAG3+ TIGIT+	0,06550	0,06885	0,03600	0,06728	0,3190
CD8+ CD28+	14,85	8,115	14,30	7,725	0,9191
CD8+ CD28+ LAG3+	0,1900	0,2065	0,1950	0,1227	0,7130
CD8+ CD28+ PD1+	0,4200	0,4147	0,3200	0,1905	0,3842
CD8+ CD28+ TIGIT+	1,360	1,312	1,830	1,068	0,1341
CD8+ CD28+ PD1+ TIGIT+	0,1030	0,2946	0,1200	0,1180	0,5787
CD8+ CD28+ PD1+ LAG3+ TIGIT+	0,03800	0,06823	0,02600	0,02792	0,7844
CD3+ CD28-	16,25	23,11	22,00	14,22	0,8330
CD3+ CD28- CD57+	8,075	10,86	14,50	11,62	0,6445
CD3+ CD28- KLRG1+	10,78	14,32	12,65	12,79	0,7019
CD3+ CD28- CD57+ KLRG1+	7,590	10,41	11,00	11,48	0,4429
CD4+ CD28-	1,330	13,41	3,580	8,596	0,2419
CD4+ CD28- CD57+	0,9100	2,305	2,215	4,685	0,3550
CD4+ CD28- KLRG1+	1,110	2,817	2,885	5,121	0,2614
CD4+ CD28- CD57+ KLRG1+	0,6400	2,287	1,830	4,681	0,3672
CD8+ CD28-	10,00	12,11	10,85	8,140	0,8700
CD8+ CD28- CD57+	7,395	8,873	8,920	6,499	0,8818
CD8+ CD28- KLRG1+	9,185	11,83	9,065	7,350	0,8636
CD8+CD28-CD57+KLRG1+	7,165	8,747	7,840	6,064	0,9378

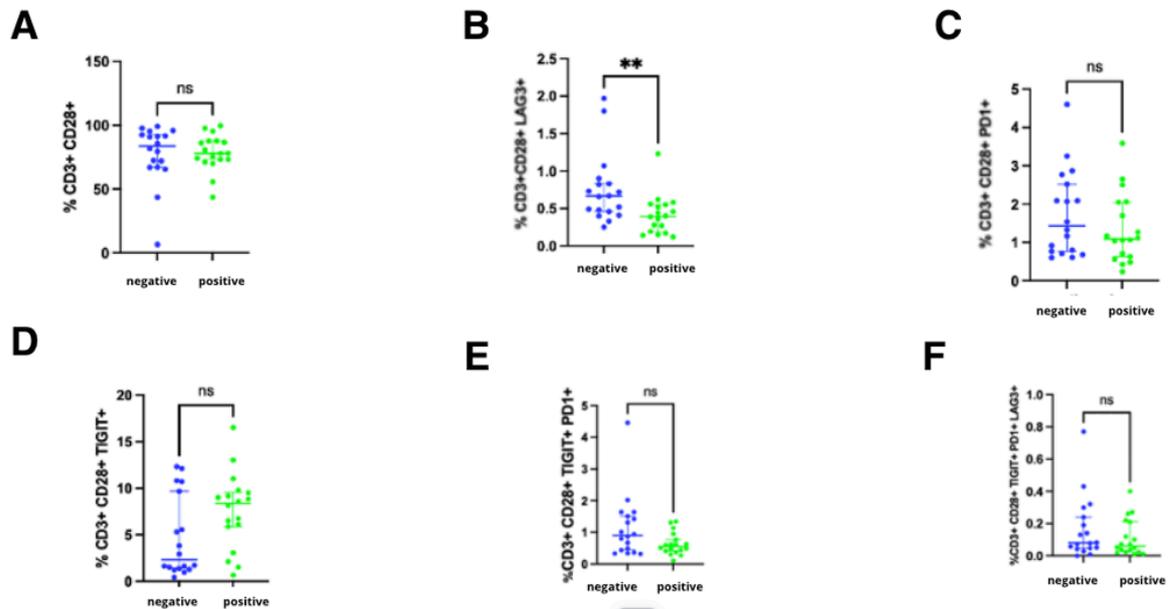


Figura 40 I grafici riportano l'espressione di HER-2 (negative n=18, low n=18) in relazione ai linfociti T exhausted-like ed esauste della famiglia dei CD3+. I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.11. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD3+CD28+ (A), CD3+CD28+LAG3+ (B), CD3+CD28+PD1+ (C), CD3+CD28+TIGIT+ (D), CD3+CD28+TIGIT+PD1+ (E) e CD3+CD28+LAG3+PD1+TIGIT+ (F) in base all'espressione di HER2.

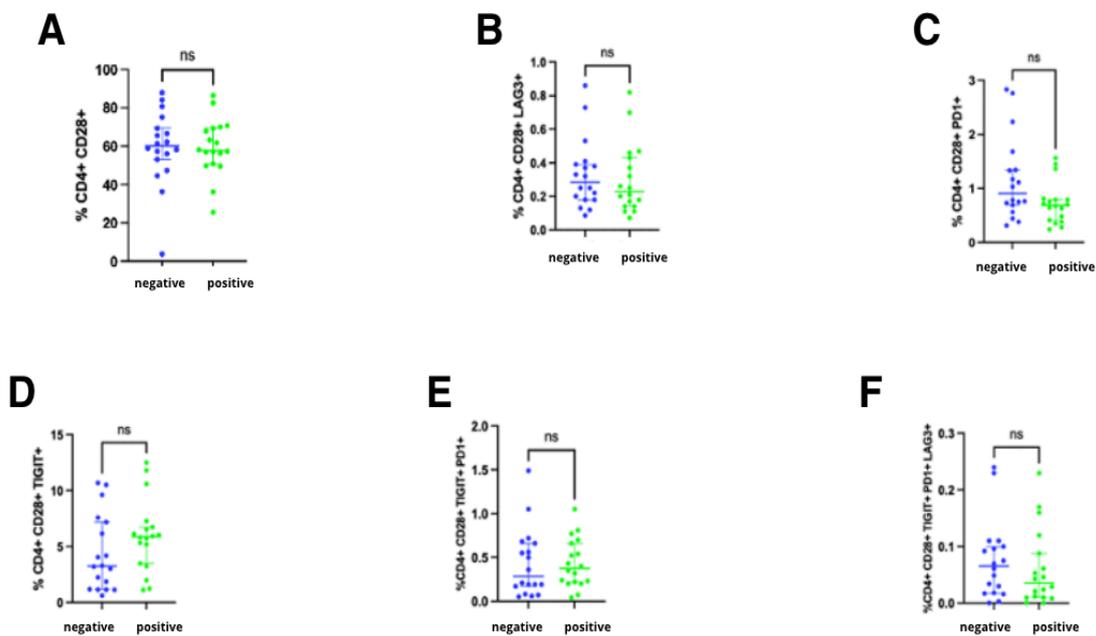


Figura 41 I grafici riportano l'espressione di HER-2 (negative n=18, low n=18) in relazione ai linfociti T exhausted-like ed esauste della famiglia dei CD4+. I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.11. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza) di CD4+CD28+ (A), CD4+CD28+LAG3+ (B), CD4+CD28+PD1+ (C), CD4+CD28+TIGIT+ (D), CD4+CD28+TIGIT+PD1+ (E) e CD4+CD28+LAG3+PD1+TIGIT+ (F) in base all'espressione di HER2.

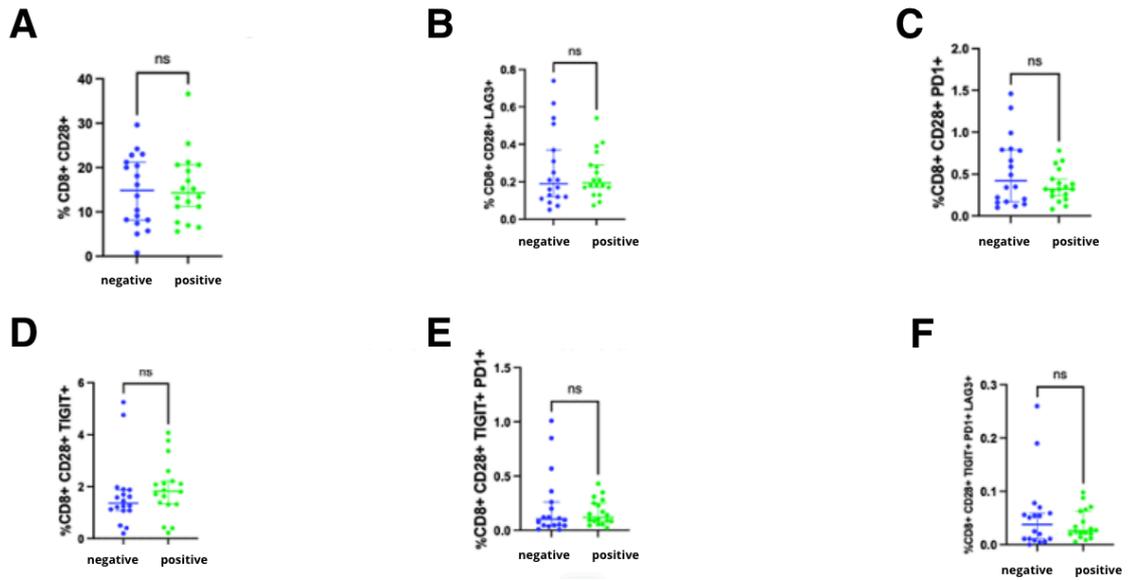


Figura 42 I grafici riportano l'espressione di HER-2 (negative n=18, low n=18) in relazione ai linfociti T exhausted-like ed esauste della famiglia dei CD8+. I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.11. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD8+CD28+ (A), CD8+CD28+LAG3+ (B), CD8+CD28+PD1+ (C), CD8+CD28+TIGIT+ (D), CD8+CD28+TIGIT+PD1+ (E) e CD8+CD28+LAG3+PD1+TIGIT+ (F) in base all'espressione di HER2.

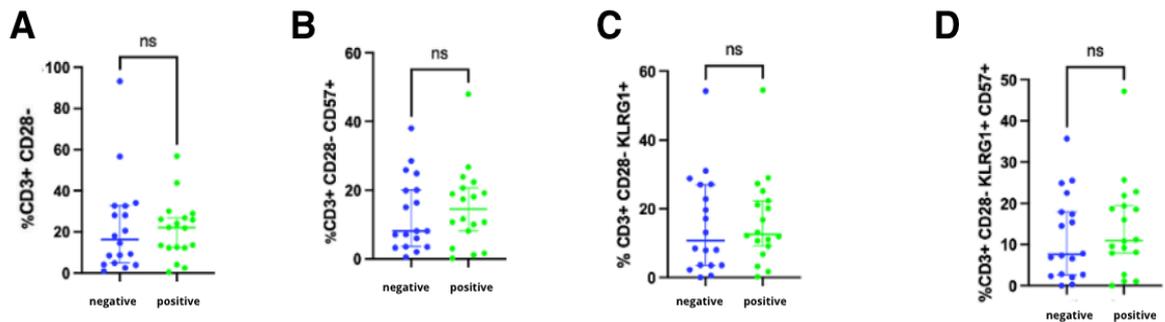


Figura 43 I grafici riportano l'espressione di HER-2 (negative n=18, low n=18) in relazione ai linfociti T senescence-like e senescenti della famiglia dei CD3+. I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.11. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD3+CD28- (A), CD3+CD28-CD57+ (B), CD3+CD28-KLRG1+ (C) e CD3+CD28-KLRG1+CD57+ (D) in base all'espressione di HER2.

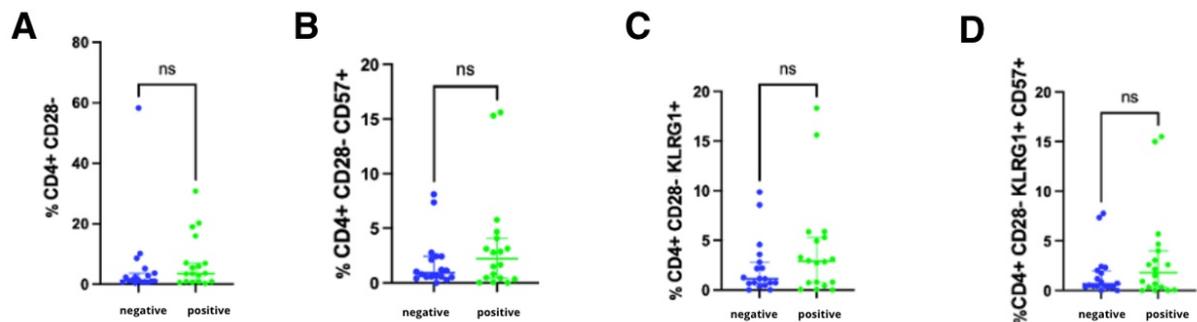


Figura 44 I grafici riportano l'espressione di HER-2 (negative n=18, low n=18) in relazione ai linfociti T senescence-like e senescenti della famiglia dei CD4+. I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.11. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD4+CD28- (A), CD4+CD28-CD57+ (B), CD4+CD28-KLRG1+ (C) e CD4+CD28-KLRG1+CD57+ (D) in base all'espressione di HER2.

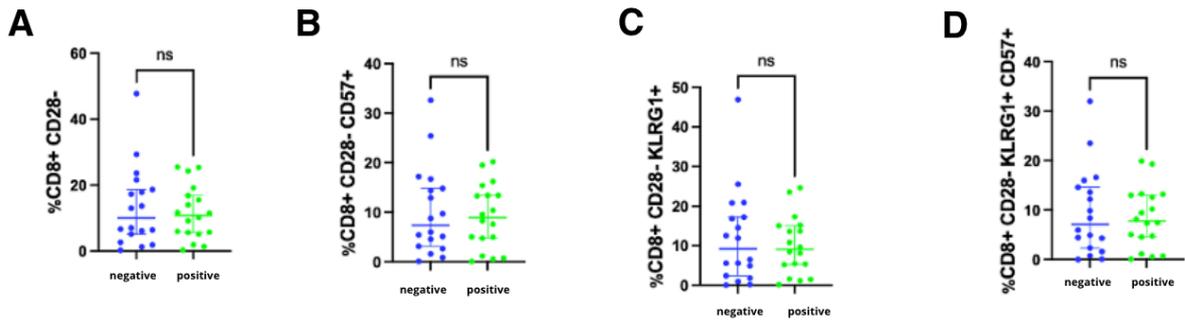


Figura 45 I grafici riportano l'espressione di HER-2 (negative n=18, low n=18) in relazione ai linfociti T senescence-like e senescenti della famiglia dei CD8+. I risultati ottenuti sono riportati nella Tab.11. I grafici riportano rispettivamente la percentuale (%) in termini di frequenza di CD8+CD28- (A), CD8+CD28-CD57+ (B), CD8+CD28-KLRG1+ (C) e CD8+CD28-KLRG1+CD57+ (D) in base all'espressione di HER2.

Abbiamo dimostrato che nel gruppo di pazienti a prognosi migliore, ovvero il gruppo *low/neg*, la percentuale di linfociti T totali circolanti CD3+ a fenotipo “*exhausted-like*” LAG3+ è significativamente inferiore rispetto al gruppo a prognosi peggiore (*positive*; Tab. 11, Fig. 40, $0,6650 \pm 0,4656$, Mann-Whitney test, $p\text{-value}=0,0038$). Inoltre, anche se non significativa, si apprezza una minor frequenza di linfociti T CD3+PD1+TIGIT+ e una maggior frequenza di CD3+TIGIT+ nel gruppo di pazienti bassa o assente espressione di HER2 (Tab. 11, Fig. 40, rispettivamente $0,9050 \pm 0,9851$, $p=0,0672$ e $8,350 \pm 4,047$, $p=0,0581$, Mann-Whitney test).

4.7 Analisi del profilo lipidomico nel plasma dei pazienti con carcinoma mammario metastatico prima dell'inizio della terapia con CDK4/6i.

In collaborazione con il gruppo di “Omica” del Prof. M. Manfredi, è stata eseguita un'analisi lipidomica basata su LS-MS/MS “*untarget*” su 30 campioni di plasma dei 58 pazienti arruolati nello studio. Quattro campioni sono stati esclusi per bassa qualità del risultato, e la concentrazione di 1139 lipidi circolanti è stata ottenuta per i rimanenti 26 campioni. Di questi, 14 pazienti hanno avuto progressione della malattia (PD) o sono deceduti. L'analisi è stata svolta mediante le analisi di Kaplan-Meier al fine di vedere l'eventuale correlazione tra la concentrazione dei lipidi in questione e la sopravvivenza libera da progressione (PFS). La significatività dell'analisi è stata successivamente calcolata con il test di Cox.

In totale, 5 lipidi hanno mostrato un'associazione statisticamente significativa con un aumento del rischio di eventi di PFS: Sfingomielina (SM 44.4 e SM 44.2), N-aciletanolamine, Fosfatidiletanolamina (PE 38.1 e PE 40.5). I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi in base alla mediana di concentrazione del lipide (*high vs low*).

Tabella 12 Lipidi significativi

Lipide	Pazienti totali	High	Low	Minima HR	Massima HR	p-value
Sfingomielina SM 44.4	26	9	17	1,04	1,61	0,016
Sfingomielina SM 44.2	26	9	17	1,02	2,27	0,0019
N-aciletanolamine NAE 18.1	26	7	19	1,07	1,73	0,0006 2
Fosfatidiletanolamina PE 38.1	26	10	16	1,18	8,84	0,021
Fosfatidiletanolamina PE 40.5	26	10	16	0,97	8,17	0,017

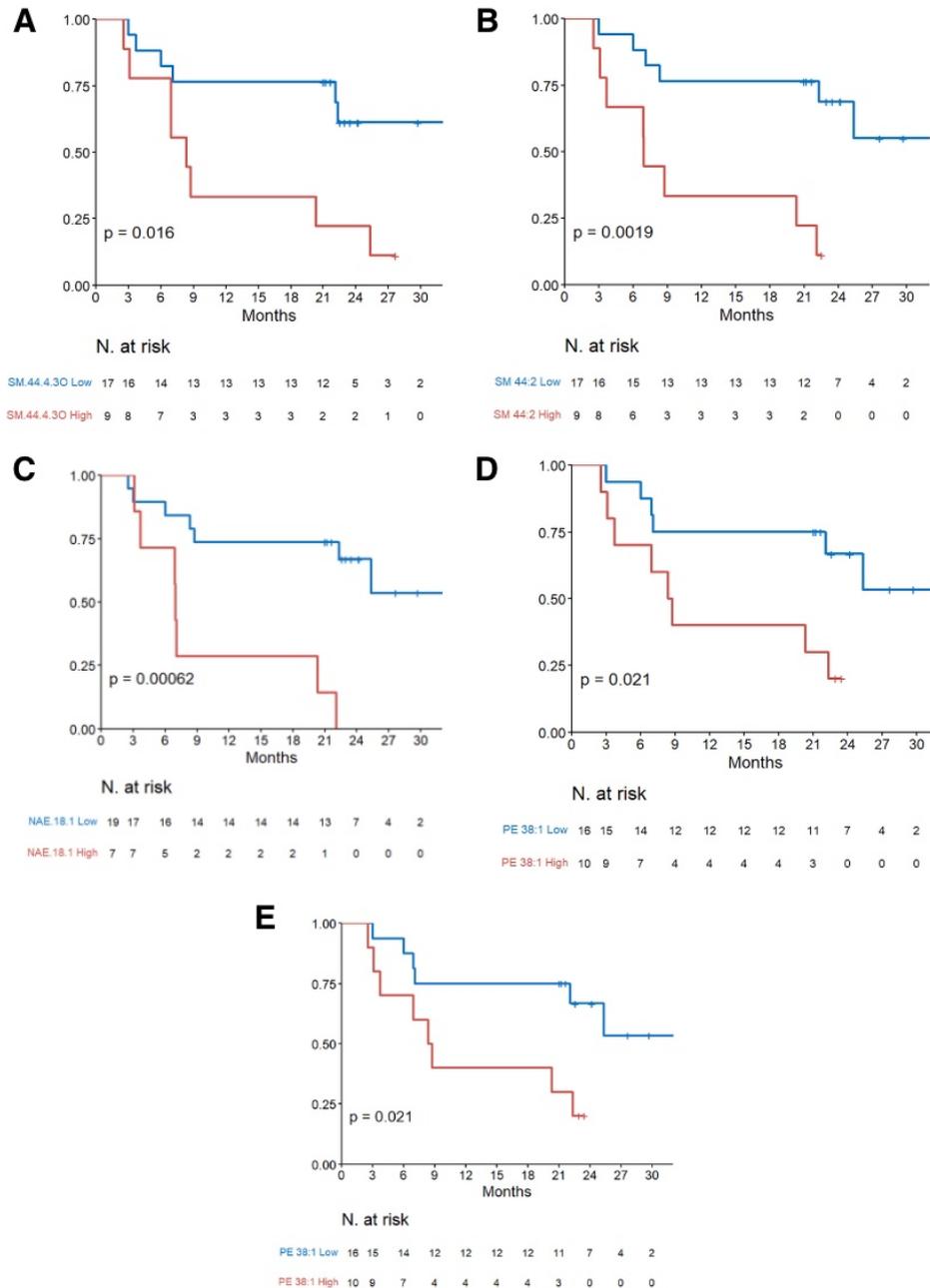


Figura 46 Grafici di progressione libera da malattia in base alla presenza dei lipidi in questione dal profilo lipidico di 36 pazienti: A (Sfingomielina SM 44.4), B (Sfingomielina SM 44.2), C (N-aciletanolamine NAE 18.1), D (Fosfatidiletanolamina PE 38.1) ed E (Fosfatidiletanolamina PE 40.). I grafici presentano sull'asse delle ascisse (X) il tempo misurato in mesi, a partire da 0 fino a 30 mesi, tre sull'asse delle ordinate (Y) è riportata la probabilità di progressione libera da malattia, variabile da 0 a 1 (0-100%).

Le analisi suggeriscono la possibilità di una correlazione tra la concentrazione di determinati lipidi, nel nostro caso Sfingomielina (SM 44.4 e SM 44.2), N-aciletanolamine, Fosfatidiletanolamina (PE 38.1 e PE 40.5) e la risposta alla terapia.

4.8 Correlazione tra il profilo lipidico e i linfociti T senescenti ed esausti nel sangue periferico

Studi recenti hanno evidenziato come la presenza di alcuni lipidi sia associata ad un particolare fenotipo e alla modifica nella frequenza dei linfociti T, sia a livello tumorale che periferico.^{52, 53}

Per cui le analisi dei profili lipidomici e la caratterizzazione dei linfociti T sembra essere rilevante per disegnare nuove prospettive diagnostiche e terapeutiche. Con queste premesse, abbiamo correlato i livelli di espressione dei lipidi più significativi analizzati nel paragrafo precedente con la frequenza dei linfociti T “*exhausted-like*” CD4+CD28+PD1+ (che erano significativamente associati alla prognosi e alla sopravvivenza, paragrafo 4.2b). Dalle analisi sembra che vi sia una correlazione positiva tra la frequenza dei linfociti “*exhausted-like*” e i lipidi NAE 18:1 e PE P-38:1 (rispettivamente, $R=0,56$, $p=0,05$ e $R=0,66$, $p=0,017$, Spearman T test).

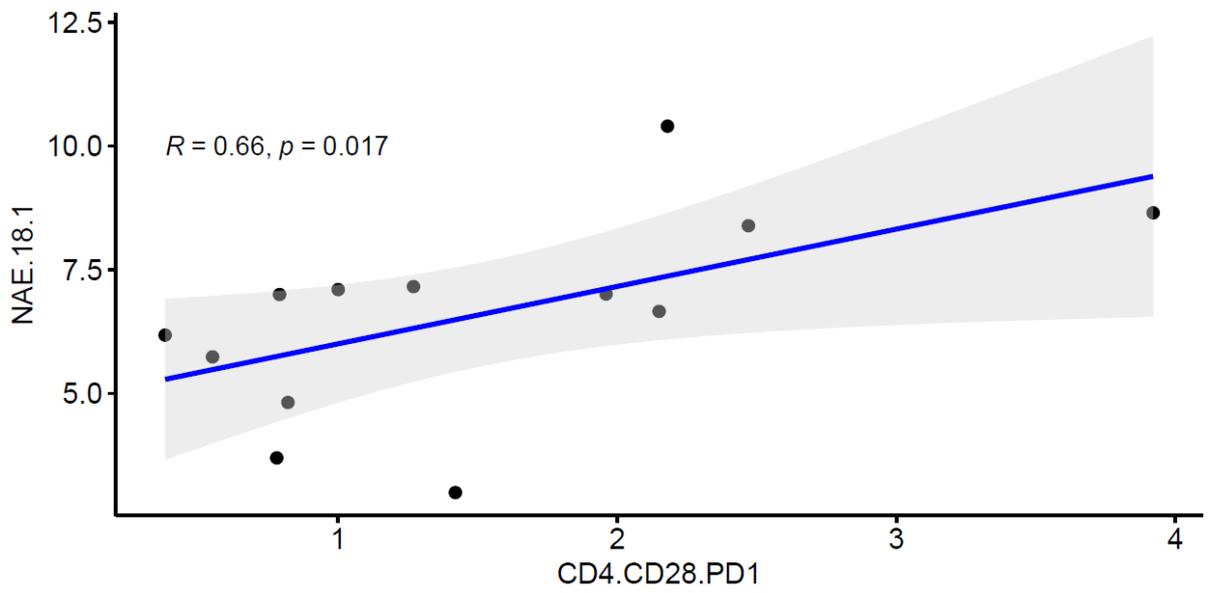
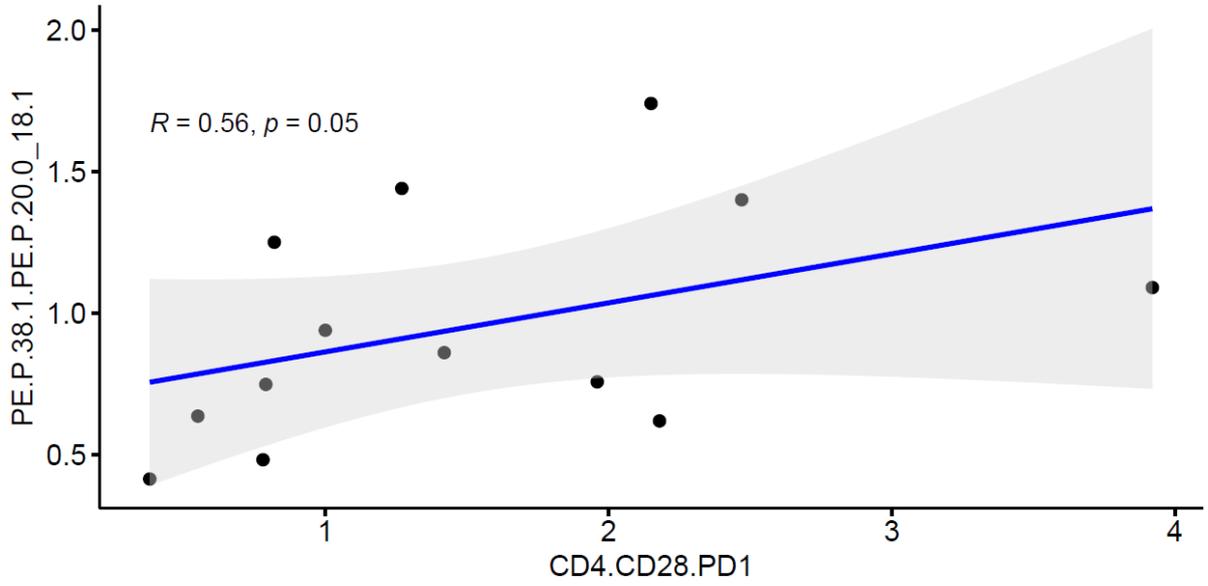


Figura 47 Test di correlazione di Spearman ha mostrato un'associazione tra i linfociti T helper PD1+ e i lipidi NAE 18:1 e PE P-38:1.

5. Discussione

Il carcinoma mammario rappresenta la causa principale di morte per le donne e, secondo i dati AIOM-AIRTUM (2020), rappresenta il 30,3% di tutti i tumori femminili in Italia, in leggera crescita soprattutto nelle giovani donne. Grazie alla diagnosi precoce e al miglioramento delle terapie, circa l'87% delle donne guarisce, specialmente se la diagnosi avviene in fase non avanzata di malattia. Nella lotta al tumore al seno la diagnosi precoce gioca un ruolo fondamentale. Prima si diagnostica, maggiori sono le probabilità di successo. Alle volte può accadere che la malattia metastatizzi in un secondo momento o che sia già in fase metastatica alla diagnosi. Il tumore della mammella può ripresentarsi sotto forma di metastasi anche dopo molti anni dall'intervento chirurgico e dalla fine delle terapie postoperatorie. Si stima che fino al 30% delle donne che sono state operate per un tumore della mammella diagnosticato in fase precoce possa negli anni avere una recidiva di malattia. L'identificazione di fattori predittivi e prognostici permette di ottimizzare le strategie terapeutiche e sviluppare nuove terapie mirate, migliorando la gestione della malattia e la qualità della vita delle pazienti.

Lo scopo principale di questo studio è l'identificazione di fattori predittivi e prognostici in pazienti affetti da carcinoma mammario metastatico ER+/HER2- in trattamento con terapia ormonale combinata con inibitori delle cicline chinasi dipendenti 4/6 (CDK4/6i). L'azione principale di questi farmaci è quello di inibire la divisione cellulare, inducendo uno stato di senescenza nelle cellule tumorali, in cui esse smettono di proliferare, ma rimangono metabolicamente attive. Anche le cellule del sistema immunitario possono andare in contro a senescenza o esaurimento (*"exhaustion"*), limitando o bloccando la loro attività antitumorale e supportando lo sviluppo di un ambiente immunosoppressivo che contribuisce a uno stato infiammatorio cronico e a una risposta immunitaria compromessa. È noto che le cellule T esauste e senescenti condividono diverse caratteristiche fenotipiche e funzionali, come compressa attività proliferativa e citotossica ed aumento dell'arresto del ciclo cellulare. Tuttavia, ogni stato è caratterizzato da un profilo molecolare, citochinico e trascrizionale unico. È stato dimostrato che nel carcinoma mammario, l'accumulo di cellule T esauste è correlato ad una prognosi peggiore e a una minore risposta alle terapie, in particolare a quelle basate su inibitori di CDK4/6.

Ad oggi la maggior parte degli studi che valuta l'impatto dei linfociti T senescenti/esausti sulla progressione tumorale è stata condotta a livello del microambiente tumorale (TME), tuttavia sempre più crescente è l'interesse di valutare le cellule T senescenti/esauste circolanti e quindi dare importanza al prelievo di sangue (ovvero alla biopsia liquida), una procedura meno invasiva rispetto alla biopsia tumorale. Inoltre, il prelievo di sangue può essere effettuato anche durante il trattamento, permettendo un monitoraggio continuo e dinamico della risposta del paziente alla terapia.

Le nostre analisi hanno evidenziato che le pazienti con progressione della malattia (PD) mostrano una riduzione dei linfociti T CD4+CD28+ e un aumento dell'espressione dei marcatori di esaurimento PD1+ e LAG3+, confermando quanto già evidenziato da altri gruppi nel TME, in cui l'aumento delle cellule T esauste è associato ad una prognosi peggiore.^{54, 55}

L'espressione di CD28 sulla superficie dei linfociti T è indice di funzionalità del linfocita, ovvero la sua presenza è associata alla capacità del linfocita di rispondere agli stimoli, per cui la diminuzione di queste cellule nelle pazienti con PD potrebbe riflettere una ridotta capacità del sistema immunitario di controllare la progressione della malattia. Di contro, l'aumento dei marcatori di exhaustion, PD1 e LAG3, potrebbe rafforzare tale ipotesi.^{56, 57, 58, 59, 60, 61, 62}

Molto interessante è il fatto che le pazienti che hanno una malattia stabile o rispondono alla terapia, presentano un aumento dell'espressione di KLRG1 sulle cellule T senescenti CD3+CD28-KLRG1+CD57+. Questo indica la presenza di un sistema immunitario "relativamente" funzionante. L'espressione di KLRG1 suggerisce che queste cellule T hanno subito numerosi cicli di divisione e hanno partecipato a molte risposte immunitarie, portandole a uno stato di senescenza, caratterizzato dall'invecchiamento e dalla perdita della capacità proliferativa. Inoltre, l'espressione di KLRG1 segnala che le cellule T hanno raggiunto uno stadio finale di maturazione, essendo ora specializzate nella risposta agli stimoli immunitari. Questo suggerisce che il sistema immunitario di queste pazienti potrebbe essere stato in grado di controllare il cancro in modo più efficace. Una maggiore presenza di queste cellule mature e senescenti potrebbe riflettere una risposta immunitaria più attiva e ben regolata contro il cancro. In altre parole, le cellule T caratterizzate da un'alta espressione di KLRG1

potrebbero giocare un ruolo importante nel mantenere la malattia sotto controllo, indicando una gestione più efficace della malattia da parte del sistema immunitario. Nei tumori HER2-positivi, la sovraespressione di HER2 non solo promuove una crescita cellulare più rapida, ma può anche attivare una risposta immunitaria più vigorosa, grazie all'infiammazione e al rilascio di antigeni tumorali capaci di reclutare e attivare le cellule T. Al contrario, nei tumori HER2 negativi, la mancanza di questa stimolazione immunitaria porta ad una minore attivazione delle cellule T, che restano cronicamente esposte agli antigeni tumorali. Questa situazione può indurre una disfunzione o esaurimento delle cellule T, che pur essendo presenti nel microambiente tumorale (TME), non riescono più a svolgere efficacemente il loro ruolo citotossico contro le cellule tumorali. Abbiamo dimostrato un aumento significativo delle cellule T circolanti con fenotipo esausto nelle pazienti che presentano una mancata espressione di HER2, e questo dato è correlabile a quanto sopra descritto nel TME: la mancata espressione di HER2 promuove lo sviluppo di cellule T a fenotipo esausto nel TME e tale condizione sembra riflettersi nel sangue periferico. A supportare tale ipotesi, saranno necessari studi che correlano il fenotipo dei linfociti T circolanti con quello dei linfociti infiltranti il tumore (TILs).

Inoltre, tumori a lenta crescita, caratterizzati da bassi livelli di Ki-67, possono creare un microambiente meno stimolante dal punto di vista immunitario, permettendo la persistenza e l'accumulo di cellule T esauste. Infatti, abbiamo dimostrato che a livello del sangue periferico, la percentuale di linfociti T esausti è maggiore nel gruppo di pazienti con elevati livelli di Ki-67 rispetto a quelli con più bassi livelli, suggerendo che a livello del TME le cellule tumorali promuovano l'espansione di cellule T a fenotipo esausto. Studi più approfonditi saranno necessari per confermare tale ipotesi.^{63, 64, 65, 66, 67}

L'integrazione della lipidomica con lo studio delle cellule T senescenti ed esauste potrebbe fornire nuove prospettive sulla biologia del cancro al seno. Analizzare come le modifiche nei lipidi influenzano la senescenza e l'esaurimento delle cellule T potrebbe rivelare meccanismi sottostanti alla risposta immunitaria alterata e alla progressione tumorale. Questo approccio combinato potrebbe consentire la scoperta di strategie terapeutiche innovative, mirate non solo a modulare l'attività delle cellule T, ma anche a ripristinare un equilibrio lipidico che favorisca una risposta immunitaria più efficace e una migliore gestione della malattia. I risultati preliminari del nostro

studio, in linea con la letteratura esistente, suggeriscono una relazione tra il metabolismo lipidico e gli stati di disfunzione delle cellule T. Abbiamo riscontrato soprattutto una relazione tra i linfociti T helper esausti, esprimenti PD1, e i livelli plasmatici di NAE 18:1 e PE P-38:1.

L'analisi lipidica delle pazienti in studio ha inoltre rivelato che concentrazioni elevate di lipidi specifici, tra cui sfingomieline, ceramidi, N-aciletanolamine e fosfatidiletanolamina, sono associate a una prognosi peggiore e a una diminuzione della probabilità di progressione libera da malattia. Questi lipidi sembrano promuovere vie di segnalazione che favoriscono la proliferazione delle cellule tumorali, facilitando la loro migrazione, formazione di metastasi e resistenza all'apoptosi. Inoltre, contribuiscono a creare un microambiente tumorale più favorevole alla crescita e diffusione del tumore, inibendo la risposta immunitaria e permettendo alle cellule tumorali di proliferare senza ostacoli significativi. D'altro canto, una bassa concentrazione plasmatica di questi lipidi è associata a una migliore progressione libera da malattia, suggerendo che potrebbero rappresentare potenziali bersagli terapeutici per limitare la crescita tumorale e migliorare la prognosi dei pazienti.

La sfingomieline, un fosfolipide composto da sfingosina, un acido grasso e un gruppo fosfato, gioca un ruolo cruciale nella fluidità e nella composizione delle membrane cellulari. Le alterazioni nei suoi livelli possono modificare la funzione dei recettori e delle proteine coinvolte nella crescita e proliferazione cellulare, influenzando i segnali che regolano la divisione e la sopravvivenza delle cellule tumorali. La sfingomieline può essere convertita in ceramide, che ha effetti variabili: può favorire la morte cellulare o, al contrario, sostenere la sopravvivenza delle cellule tumorali. Le modifiche nel metabolismo della sfingomieline non solo influenzano la crescita tumorale, ma possono anche contribuire alla resistenza ai trattamenti, rendendo le cellule tumorali meno sensibili ai farmaci e complicando il trattamento del cancro al seno.⁶⁸

La ceramide, un metabolita della sfingomieline, ha un ruolo complesso nel cancro al seno, influenzando la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali. A seconda della sua concentrazione e delle vie metaboliche coinvolte, può avere effetti sia pro-apoptotici, favorendo la morte cellulare, sia anti-apoptotici, prevenendola. Le cellule tumorali spesso mostrano alterazioni nel metabolismo della ceramide, che possono contribuire alla loro capacità di evitare la morte cellulare e continuare a proliferare. I cambiamenti nei livelli di ceramide possono influenzare la risposta del cancro al seno

ai trattamenti: elevati livelli possono aumentare la sensibilità delle cellule tumorali alla chemioterapia e alla radioterapia, mentre alcune cellule possono adattarsi per ridurre i livelli di ceramide o modificare il suo metabolismo per difendersi dai trattamenti.⁶⁹

Le N-aciletanolamine (NAE), inclusi composti come l'aciletanolamina, stanno emergendo come fattori significativi nella crescita e progressione del tumore. Questi lipidi bioattivi modulano la segnalazione cellulare, la proliferazione e l'invasività del cancro, con cambiamenti nei loro livelli che riflettono modifiche nel metabolismo cellulare legate alla progressione tumorale e alla risposta ai trattamenti.⁷⁰

Infine, la fosfatidiletanolamina (PE) è un altro fosfolipide essenziale nelle membrane cellulari, cruciale per la regolazione della fluidità della membrana, la segnalazione cellulare e l'apoptosi. Alterazioni nei livelli di PE possono influenzare la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali, modificando il metabolismo cellulare e la risposta ai trattamenti. La PE impatta l'integrità della membrana cellulare e i segnali intracellulari, influenzando così la proliferazione e la metastasi tumorale.⁷¹

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che i linfociti T esausti e senescenti associati ad un profilo lipidomico, potrebbero essere considerati come biomarcatori nel tumore al seno metastatico ER+/HER2-. Non solo, ma una strategia terapeutica mirata, che consideri sia i marcatori di *exhaustion* e senescenza delle cellule T sia il profilo lipidico, potrebbe migliorare la gestione clinica di questi pazienti. Ulteriori studi effettuati su una coorte di pazienti più ampia sono necessari per confermare queste osservazioni e per esplorare i meccanismi molecolari, al fine di sviluppare interventi più efficaci e personalizzati contro la progressione del carcinoma mammario metastatico. Infatti, uno dei limiti di questo studio non è rappresentato solo dalla numerosità campionaria, che andrà aumentata, ma anche dal fatto che per definire il reale impatto dei linfociti T senescenti/esausti circolanti sulla progressione e prognosi dei pazienti con carcinoma mammario metastatico è fondamentale valutare le stesse popolazioni anche nel TME.

6. Conclusione

Questo studio mette in luce come i biomarcatori e la biopsia liquida diventino sempre più importanti nella diagnosi e nella cura del paziente oncologico. I risultati della nostra ricerca suggeriscono che la profilazione lipidomica nel plasma e la caratterizzazione dei linfociti T circolanti potrebbero essere metodi validi per valutare la prognosi e l'efficacia del trattamento nelle pazienti con carcinoma mammario avanzato ER+/HER2- trattate con inibitori di CDK4/6. Analizzare i profili lipidici e dei linfociti T potrebbe aiutare a identificare le pazienti con un esito peggiore e a rilevare precocemente quelle che potrebbero non beneficiare a lungo termine di questo trattamento. ^{72, 28}

7. Sitografia

1. AIOM 2023_AIOM_NDC.
2. Veronesi, U., Boyle, P., Goldhirsch, A., Orecchia, R., and Viale, G. (2005). Breast cancer. *The Lancet* 365, 1727–1741. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66546-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66546-4).
3. Panoramica sulle patologie mammarie - Problemi di salute delle donne - Manuale MSD, versione per i pazienti <https://www.msdmanuals.com/it-it/casa/problemi-di-salute-delle-donne/patologie-mammarie/panoramica-sulle-patologie-mammarie>.
4. ESMO ESMO Clinical Practice Guidelines: Breast Cancer. <https://www.esmo.org/guidelines/guidelines-by-topic/esmo-clinical-practice-guidelines-breast-cancer>.
5. Tumore al seno: sintomi, prevenzione, cause, diagnosi <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-del-seno>.
6. Tomosintesi: cos'è e quando è indicata | Istituto Clinico Catanese - Humanitas Catania <https://www.humanitascatania.it/news/tomosintesi-cose-e-quando-e-indicata/>.
7. Ecografia mammaria <https://www.airc.it/cancro/affronta-la-malattia/guida-agli-esami/ecografia-mammaria>.
8. Risonanza magnetica seno - In cosa consiste l'esame? <https://www.materdomini.it/visite-ed-esami/risonanza-magnetica-seno/>.
9. Budny, A., Starosławska, E., Budny, B., Wójcik, R., Hys, M., Kozłowski, P., Budny, W., Brodzik, A., and Burdan, F. (2019). [Epidemiology and diagnosis of breast cancer]. *Pol Merkur Lekarski* 46, 195–204.
10. Breast Cancer Staging: Updates in the AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition, and Current Challenges for Radiologists, From the AJR Special Series on Cancer Staging | AJR <https://www.ajronline.org/doi/10.2214/AJR.20.25223>.
11. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players | Bentham Science <https://www.eurekaselect.com/article/75294>.
12. Molecular classification of estrogen receptor-positive/luminal breast cancers - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22156833/>.

13. ESMO expert consensus statements (ECS) on the definition, diagnosis, and management of HER2-low breast cancer - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37269905/>.
14. Ki-67 cut-off in hormone responsive breast cancer I BCTT <https://www.dovepress.com/the-proper-ki-67-cut-off-in-hormone-responsive-breast-cancer-a-monoin-peer-reviewed-fulltext-article-BCTT>.
15. Il recettore del progesterone protagonista nei tumori mammari ad alta proliferazione I Univadis <https://www.univadis.it/viewarticle/il-recettore-del-progesterone-protagonista-nei-tumori-mammari-ad-alta-proliferazione-716264>.
16. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29472313/>.
17. europa donna il tumore al seno metastatico.
18. A meta-analysis of FDG-PET for the evaluation of breast cancer recurrence and metastases - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15803356/>.
19. Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8708708/>.
20. Curing Metastatic Breast Cancer - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26759458/>.
21. La terapia ormonale dei tumori <https://www.airc.it/cancro/affronta-la-malattia/guida-alle-terapie/la-terapia-ormonale-dei-tumori>.
22. Ormonoterapia per il cancro della mammella - Aimac - Associazione Italiana Malati di Cancro <https://www.aimac.it/libretti-tumore/cancro-mammella-seno/ormonoterapia-cancro-mammella>.
23. Letrozolo <https://www.humanitas.it/enciclopedia/principi-attivi/antineoplastici-antitumorali/letrozolo/>.
24. Tamoxifene: che cos'è? - Humanitas <https://www.humanitas.it/enciclopedia/principi-attivi/antineoplastici-antitumorali/tamoxifene/>.
25. Fulvestrant - Informazioni sui farmaci <https://www.informazionisuifarmaci.it/fulvestrant>.
26. Ardizzoni, D.A., Benecchi, D.L., Brausi, D.M., and Miselli, D.M. (2008). Gruppo di lavoro multidisciplinare Aven.

27. Goserelin - Aimac - Associazione Italiana Malati di Cancro
<https://www.aimac.it/farmaci-tumore/terapia-ormonale/goserelin>.
28. Watt, A.C., and Goel, S. (2022). Cellular mechanisms underlying response and resistance to CDK4/6 inhibitors in the treatment of hormone receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Research* 24, 17. <https://doi.org/10.1186/s13058-022-01510-6>.
29. Frontiers | Mapping Breast Cancer Microenvironment Through Single-Cell Omics
<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.868813/full>.
30. [Biology and differentiation of lymphocytes in the classification of lymphomas] - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2291005/>.
31. Antigeni tumorali - Ematologia e oncologia - Manuali MSD Edizione Professionisti <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/ematologia-e-oncologia/immunologia-dei-tumori/antigeni-tumorali>.
32. Cellule killer nella lotta contro il cancro <https://www.airc.it/news/cellule-killer-contro-i-tumori>.
33. The immune system and inflammation in breast cancer - ScienceDirect <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0303720713002414>.
34. L'identikit dei linfociti che infiltrano il tumore <https://www.airc.it/traguardi-dei-ricercatori/lidentikit-dei-linfociti-che-infiltrano-il-tumore>.
35. Risposta dell'ospite ai tumori - Ematologia e oncologia - Manuali MSD Edizione Professionisti <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/ematologia-e-oncologia/immunologia-dei-tumori/risposta-dell-ospite-ai-tumori>.
36. Tumor Cell Senescence in Cancer Treatment1 | Cancer Research | American Association for Cancer Research <https://aacrjournals.org/cancerres/article/63/11/2705/509985/Tumor-Cell-Senescence-in-Cancer-Treatment1>.
37. Effects of Breast Cancer Adjuvant Chemotherapy Regimens on Expression of the Aging Biomarker, p16INK4a - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33409457/>.
38. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31806905/>.

39. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30648461/>.
40. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33262144/>.
41. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23298609/>.
42. Different sensitivities of senescent breast cancer cells to immune cell-mediated cytotoxicity - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31250942/>.
43. Defining “T cell exhaustion” - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31570879/>.
44. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer - PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31820027/>.
45. The role of lipids in cancer progression and metastasis: Cell Metabolism [https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131\(22\)00447-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1550413122004478%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131(22)00447-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1550413122004478%3Fshowall%3Dtrue).
46. Lipid biology of breast cancer - ScienceDirect <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1388198113000814?via%3Dihub>.
47. Bove, M., and Refoni, P. LA CITOMETRIA A FLUSSO.
48. Roederer, M. (2001). Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* 45, 194–205. [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20011101\)45:3<194::aid-cyto1163>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20011101)45:3<194::aid-cyto1163>3.0.co;2-c).
49. Labtestsonline - Citofluorimetria <https://www.labtestsonline.it/approfondimenti/citofluorimetria.html>.
50. Cattrini, C., Manfredi, M., Barboro, P., Ghirimoldi, M., Mennitto, A., Martini, V., Battioni, A., Le Van, M., Gobbato, S., Branni, C., et al. (2023). Untargeted lipidomics reveal association of elevated plasma C18 ceramide levels with reduced survival in metastatic castration-resistant prostate cancer patients. *Sci Rep* 13, 17791. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44157-9>.
51. Lombardi, A., Lazzeroni, R., Bersigotti, L., Vitale, V., and Amanti, C. (2021). The Proper Ki-67 Cut-Off in Hormone Responsive Breast Cancer: A Monoinstitutional

Analysis with Long-Term Follow-Up. *BCTT Volume 13*, 213–217. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S305440>.

52. *Frontiers | The Role of Lipid Metabolism in T Lymphocyte Differentiation and Survival*

<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2017.01949/full>.

53. Lou, W., Gong, C., Ye, Z., Hu, Y., Zhu, M., Fang, Z., and Xu, H. (2022). Lipid metabolic features of T cells in the Tumor Microenvironment. *Lipids in Health and Disease* *21*, 94. <https://doi.org/10.1186/s12944-022-01705-y>.

54. Dong, Y., Li, X., Zhang, L., Zhu, Q., Chen, C., Bao, J., and Chen, Y. (2019). CD4+ T cell exhaustion revealed by high PD-1 and LAG-3 expression and the loss of helper T cell function in chronic hepatitis B. *BMC Immunology* *20*, 27. <https://doi.org/10.1186/s12865-019-0309-9>.

55. Fromentin, R., Bakeman, W., Lawani, M.B., Khoury, G., Hartogensis, W., DaFonseca, S., Killian, M., Epling, L., Hoh, R., Sinclair, E., et al. (2016). CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART. *PLOS Pathogens* *12*, e1005761. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005761>.

56. Yang, X., Li, Q., and Zeng, T. (2024). Peripheral CD4+ T cells correlate with response and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving chemo-immunotherapy. *Front. Immunol.* *15*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1364507>.

57. Richardson, J.R., Schöllhorn, A., Gouttefangeas, C., and Schuhmacher, J. (2021). CD4+ T Cells: Multitasking Cells in the Duty of Cancer Immunotherapy. *Cancers* *13*, 596. <https://doi.org/10.3390/cancers13040596>.

58. *Activation of the PD-1 Pathway Contributes to Immune Escape in EGFR-Driven Lung Tumors | Cancer Discovery | American Association for Cancer Research* <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/3/12/1355/3845/Activation-of-the-PD-1-Pathway-Contributes-to>.

59. Ji, W., Zhang, B., Sun, X., Ma, L., Zhang, X., Qian, W., Fu, W., Li, J., and Zhu, D. (2023). Inhibition of tumor immune escape by blocking PD-1/PD-L1 engagement with dual-targeting molecularly imprinted polymer layer. *Cancer Nanotechnology* *14*, 51. <https://doi.org/10.1186/s12645-023-00209-3>.

60. Wang, L., Wu, Y., Kang, K., Zhang, X., Luo, R., Tu, Z., Zheng, Y., Lin, G., Wang, H., Tang, M., et al. (2024). CDK4/6 inhibitor abemaciclib combined with low-dose radiotherapy enhances the anti-tumor immune response to PD-1 blockade by inflaming the tumor microenvironment in Rb-deficient small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 13, 1032–1046. <https://doi.org/10.21037/tlcr-24-33>.
61. PD-1/PD-L1 axis: implications in immune regulation, cancer progression, and translational applications | *Journal of Molecular Medicine* <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-024-02463-3>.
62. Budimir, N., Thomas, G.D., Dolina, J.S., and Salek-Ardakani, S. (2022). Reversing T-cell Exhaustion in Cancer: Lessons Learned from PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Immunology Research* 10, 146–153. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-21-0515>.
63. Moumneh, M.B., Bou Dargham, T., Mrad, M., and Dbaiibo, G. (2022). Sphingolipid Metabolism in Cancer: Potential Therapeutic Target. In *Handbook of Cancer and Immunology*, N. Rezaei, ed. (Springer International Publishing), pp. 1–39. https://doi.org/10.1007/978-3-030-80962-1_264-1.
64. Nagasaki, J., and Togashi, Y. (2022). A variety of ‘exhausted’ T cells in the tumor microenvironment. *International Immunology* 34, 563–570. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxac013>.
65. Differential roles of RIPK1 and RIPK3 in TNF-induced necroptosis and chemotherapeutic agent-induced cell death | *Cell Death & Disease* <https://www.nature.com/articles/cddis201516>.
66. Correlation of MKI67 with prognosis, immune infiltration, and T cell exhaustion in hepatocellular carcinoma | *BMC Gastroenterology* | Full Text <https://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12876-021-01984-2>.
67. Song, P.N., Mansur, A., Dugger, K.J., Davis, T.R., Howard, G., Yankeelov, T.E., and Sorace, A.G. (2020). CD4 T-cell immune stimulation of HER2 + breast cancer cells alters response to trastuzumab in vitro. *Cancer Cell Int* 20, 544. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01625-w>.
68. Corsetto, P.A., Zava, S., Rizzo, A.M., and Colombo, I. (2023). The Critical Impact of Sphingolipid Metabolism in Breast Cancer Progression and Drug Response. *Int J Mol Sci* 24, 2107. <https://doi.org/10.3390/ijms24032107>.

69. Wajapeyee, N., Beamon, T.C., and Gupta, R. (2024). Roles and therapeutic targeting of ceramide metabolism in cancer. *Molecular Metabolism* 83, 101936. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2024.101936>.
70. Fraguas-Sánchez, A.I., Martín-Sabroso, C., and Torres-Suárez, A.I. (2018). Insights into the effects of the endocannabinoid system in cancer: a review. *Br J Pharmacol* 175, 2566–2580. <https://doi.org/10.1111/bph.14331>.
71. Guan, Y., Chen, X., Wu, M., Zhu, W., Arslan, A., Takeda, S., Nguyen, M.H., Majeti, R., Thomas, D., Zheng, M., et al. (2020). The Phosphatidylethanolamine Biosynthesis Pathway Provides a New Target for Cancer Chemotherapy. *J Hepatol* 72, 746–760. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.11.007>.
72. Wagner, V., and Gil, J. (2020). Senescence as a therapeutically relevant response to CDK4/6 inhibitors. *Oncogene* 39, 5165–5176. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1354-9>.