



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Nutrizione Ambiente

ELABORATO FINALE

**Adenocarcinoma gastrico: importanza dei marcatori molecolari per la
valutazione prognostica e predittiva di risposta a terapia bersaglio**

Candidata: Giulia Andreoletti

Relatore: Prof. Stefania Erra

Stage svolto presso la Clinica S. Rita, Policlinico di Monza

Tutor esterno: Dott.ssa Stefania Erra

Responsabile Ente: Dott.ssa Stefania Erra

Anno accademico 2025/2026

Alla mia adorata

Nonna Anna

ovunque tu sia

A mia mamma

A mio papà

A mia sorella

A chi ha creduto in me fin dall'inizio alla fine
A chi mi ha confortata e spinta a non mollare
A me stessa, alla mia determinazione, ai miei sogni

Sommario

1.	Introduzione	7
1.1	Stomaco	7
1.2	Adenocarcinoma gastrico	8
1.2.1	Epidemiologia: incidenza e mortalità.....	8
1.2.2	Fattori di rischio	10
1.2.3	Carcinogenesi e lesioni precancerose.....	11
1.2.4	Presentazione clinica	12
1.2.5	Classificazione istopatologica e molecolare.....	13
1.2.6	Diagnosi	15
1.2.7	Fattori prognostici	16
1.2.8	Terapia.....	16
2.	Obiettivo.....	18
3.	Materiali e metodi	19
3.1	Dal campione al vetrino	19
3.2	Analisi morfologica.....	19
3.3	Analisi immunoistochimica.....	19
3.3.1	Ventana anti-HER2 (clone 4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.....	21
3.3.2	Ventana Anti-Pan Keratin, Cytokeratin 8 & 18, anti-Cytokeratin 7 e CEA	23
3.3.3	Ventana PD-L1 (clone SP263).....	24
3.3.4	Ventana anti-MLH1, Ventana anti-PMS2, Ventana anti-MSH2 e Ventana anti-MSH6	25
4.	Risultati	27
4.1	Analisi casistica.....	29
5.	Discussione	45
6.	Conclusione.....	51
7.	Appendice	53

8. Bibliografia	59
9. Ringraziamenti	63

1. Introduzione

1.1 Stomaco

Lo stomaco è un organo cavo presente nella cavità addominale in rapporto superiormente con l'esofago tramite il cardias (sfintere esofageo inferiore) e inferiormente con la prima porzione d'intestino tenue detta duodeno tramite lo sfintere pilorico. In esso si riconoscono topograficamente quattro diverse porzioni:

- Il **cardias**: regione circostante l'esofago;
- Il **fondo**: porzione superiore dilatata;
- Il **corpo**: porzione più ampia dello stomaco;
- La **parte pilorica**: zona più stretta che termina nello sfintere pilorico.

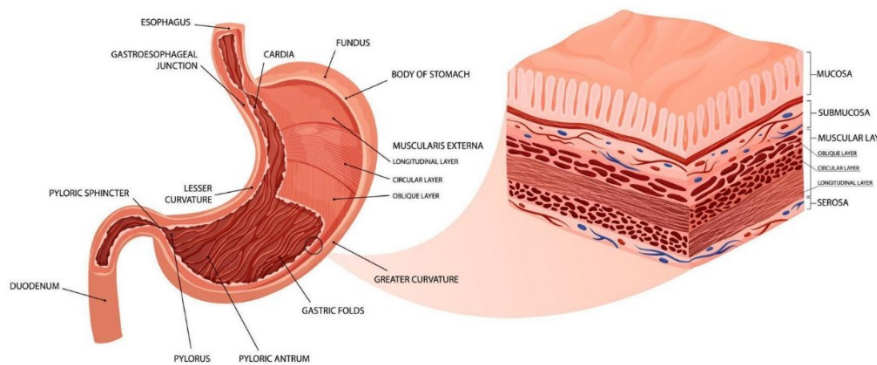


Figura 1 - Illustrazione anatomica dello stomaco

La parete gastrica, come gran parte del tratto gastrointestinale, presenta quattro diversi strati visualizzabili in figura 1:

- La **tonaca mucosa** che presenta un epitelio ghiandolare;
- La **tonaca sottomucosa** costituita da tessuto connettivo lasso in cui si trovano vasi ematici, linfatici e nervi;
- La **tonaca muscolare** formata da tre strati di cellule muscolari lisce;
- La **tonaca sierosa** rappresentata dal peritoneo viscerale che ricopre la superficie esterna dello stomaco.

La mucosa gastrica presenta delle differenze in relazione alle zone topografiche costituite da elementi ghiandolari. Nel cardias si ritrova una mucosa muco-secerne che circonda l'ingresso dell'esofago e lo protegge da eventuali reflussi acidi dello stomaco. Diversamente nel fondo e nel corpo la mucosa è formata da ghiandole tubulari semplici situate nelle fossette gastriche che producono e secernono il succo gastrico, una soluzione acquosa contenente acido cloridrico e l'enzima digestivo pepsina, e il muco protettivo.

In particolare, queste ghiandole tubulari sono formate da diversi tipi cellulari:

- Cellule del colletto a secrezione mucosa;
- Cellule staminali in grado di sostituire sia le cellule epiteliali che ghiandolari;
- Cellule parietali responsabili della produzione di acido cloridrico e del fattore intrinseco che favorisce l'assorbimento della vitamina B₁₂;
- Cellule principali che producono granuli di zimogeno ricchi di pepsinogeno (precursore della pepsina);
- Cellule di tipo neuroendocrino secernenti ormoni che regolano localmente la funzionalità gastrica.

Le ghiandole presenti invece nella regione pilorica si differenziano dalle precedenti in quanto sono tubulari ramificate con prevalentemente cellule muco-secernenti intervallate da cellule neuroendocrine. Quest'ultime sono denominate cellule G e secernono l'ormone peptidico gastrina che stimola la secrezione di acido cloridrico [1], [2].

La funzione principale dello stomaco è quella di permettere il passaggio del cibo proveniente dall'esofago consentendone l'immissione nell'intestino e contemporaneamente consentire una prima digestione di proteine e grassi attraverso l'azione dei succhi gastrici e degli enzimi presenti. La funzione digestiva è agevolata dalla contrazione della muscolatura gastrica che permette il rimescolamento del contenuto dello stomaco. A livello dello stomaco è anche possibile l'assorbimento di pochissime sostanze, tra cui l'acqua e l'alcol [3].

1.2 Adenocarcinoma gastrico

L'adenocarcinoma gastrico è un tumore epiteliale maligno che rappresenta il 95% dei tumori dello stomaco [4] e origina da una crescita incontrollata di cellule a livello della mucosa che riveste l'interno dell'organo. Può essere distinto in base alla localizzazione anatomica in prossimale se localizzato in prossimità dell'esofago o distale se situato vicino al piloro o al duodeno. Il 50% di tutti i tumori gastrici si trova a livello della porzione più distale dello stomaco denominata come antro pilorico [5].

1.2.1 Epidemiologia: incidenza e mortalità

Il carcinoma gastrico è classificato come il quinto tumore in termini sia di incidenza che di mortalità. Basandosi sui dati riportati sulla piattaforma GLOBOCAN, un database promosso dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (AIRC), nel 2022 a livello mondiale si sono registrati oltre 968000 nuovi casi di tumore gastrico e il numero di decessi correlati a tale patologia

è stimato a circa 660000 persone. L'elevata mortalità è dovuta al fatto che nella maggior parte dei casi l'adenocarcinoma gastrico viene diagnosticato in una fase avanzata della malattia e di conseguenza si evidenzia il più delle volte la presenza di metastasi ai linfonodi o ad altri organi [6].

Population	Population code (ISO/UN)	Number	ASR (World)	Crude Rate	Cum. risk 74
Africa	903	33 352	4.0	2.4	0.46
Latin America and the Caribbean	904	74 379	8.5	11.2	0.95
Northern America	905	29 675	4.1	8.0	0.48
Europe	908	135 610	7.9	18.1	0.96
Oceania	909	3 977	5.5	9.1	0.63
Asia	935	691 791	11.0	14.9	1.3
Total		968 784	9.2	12.3	1.1

Figura 2 - Incidenza del cancro allo stomaco relativo a entrambi i sessi. Anno 2022

Population	Population code (ISO/UN)	Number	ASR (World)	Crude Rate	Cum. risk 74
Africa	903	28 730	3.5	2.0	0.40
Latin America and the Caribbean	904	57 895	6.5	8.7	0.72
Northern America	905	13 367	1.7	3.6	0.18
Europe	908	95 431	5.2	12.8	0.61
Oceania	909	2 146	2.8	4.9	0.31
Asia	935	462 606	7.2	10.0	0.80
Total		660 175	6.1	8.4	0.69

Figura 3 - Mortalità del cancro allo stomaco relativo a entrambi i sessi. Anno 2022

L'incidenza globale del cancro gastrico mostra un'ampia variazione geografica come mostrato in figura 4. I tassi più elevati si verificano nell'Asia nord-orientale, nell'Europa Orientale, nell'America meridionale e centrale. Ad esempio, in Giappone e in Corea il carcinoma gastrico è la più frequente patologia tumorale diagnosticata negli uomini mentre in Cina è la principale causa di morte correlata a una patologia tumorale. L'Europa occidentale, l'Africa subsahariana, l'Australia e il Nord America, per contro, sono i Paesi in cui si ha una minor incidenza e il cancro gastrico rappresenta uno dei tumori meno comunemente diagnosticati [7], [8]. Il motivo di questa variazione geografica non essendo completamente correlabile e spiegabile con le condizioni di sviluppo socioeconomiche dei vari Paesi trova una spiegazione nella distribuzione dell'incidenza dell'infezione da *Helicobacter pylori*. Si tratta di uno dei principali fattori di rischio per il tumore gastrico il cui legame con lo sviluppo tumorale dipende dalle differenze nella genetica batterica e dell'ospite, dall'età di acquisizione dell'infezione e da fattori ambientali. Nella diversa distribuzione dei casi hanno quindi un ruolo anche la genetica e il diverso stile di vita che comprende anche le abitudini alimentari [6], [7], [9].

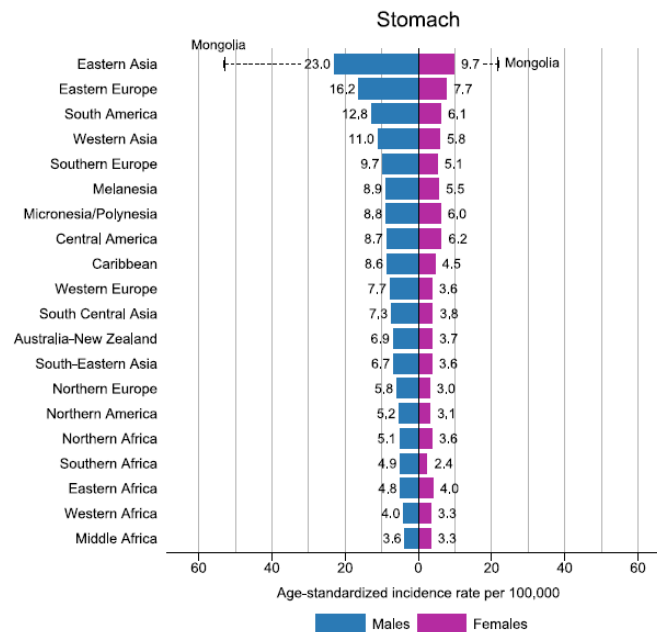


Figura 4 - Dati GLOBOCAN 2022 relativi all'incidenza del cancro allo stomaco nei vari Paesi

L'età media alla diagnosi è di 68 anni [4] e per quanto riguarda il genere i tassi d'incidenza dell'adenocarcinoma gastrico risultano essere due o tre volte più elevati negli uomini rispetto alle donne [6].

Negli ultimi cinquant'anni si è registrato un calo dei tumori gastrici di tipo intestinale nella zona distale dello stomaco dovuto a diversi fattori quali: una migliore conservazione degli alimenti, accesso ad acqua pulita, a una dieta volta a ridurre la promozione del cancro gastrico e all'eradicazione di *H. pylori* [7], [8]. Tuttavia, i casi di cancro gastrico di tipo diffuso localizzati nella zona prossimale dello stomaco sono in aumento e per tanto la patologia continua ad avere un'elevata incidenza e mortalità [8].

1.2.2 Fattori di rischio

La principale causa di adenocarcinoma gastrico è stata riconosciuta nell'infezione da *Helicobacter pylori*. Si tratta di un batterio in grado di infettare lo stomaco eludendo il sistema immunitario dell'ospite e invadendo la mucosa provocando gastriti superficiali o atrofiche, queste a loro volta possono evolvere in metaplasia gastrica che infine può trasformarsi in cancro oppure in ulcere peptiche. Il differente esito dell'infezione da *H. pylori* dipende principalmente dalla porzione di stomaco in cui il batterio si localizza. Le infezioni che si sviluppano a livello del cardias sono infatti responsabili dello sviluppo di ulcera gastrica causata dall'aumento di produzione di acido da parte del batterio e pertanto generalmente non sono correlate con l'adenocarcinoma gastrico. Se però l'infezione si localizza nella regione dell'antro porta

l'individuo ha una predisposizione verso la gastrite atrofica che può a sua volta evolvere in una lesione precancerosa e successivamente in un tumore gastrico [10].

L'infezione da *H. pylori* rientra tra i fattori di rischio modificabili per il carcinoma gastrico insieme all'obesità e al reflusso gastroesofageo.

Nei pazienti obesi l'aumentato rischio di sviluppare un tumore sembra essere correlato con la presenza di tutta una serie di alterazioni metaboliche quali l'alterazione dei livelli di adiponectina e leptina, una diversa produzione di glucocorticoidi e steroidi sessuali, la presenza di stress ossidativo e un elevato livello di marcatori infiammatori. L'obesità può anche aumentare l'incidenza del reflusso gastroesofageo che è una causa riconosciuta dell'esofago di Barrett e infine dell'adenocarcinoma. Questa correlazione tra obesità e cancro evidenzia quindi l'importanza della perdita di peso per i soggetti che si trovano in condizioni di sovrappeso o obesità vera e propria al fine di eliminare un fattore predisponente la formazione del tumore gastrico [11].

Tra i fattori di rischio modificabili è inoltre possibile includere l'abuso di alcol, l'abitudine a fumare tabacco, l'elevato consumo di sale, il consumo di carne rossa e processata, il ridotto consumo di frutta e verdura fresca e l'esposizione alle radiazioni.

Infine, è possibile l'identificazione di fattori di rischio non modificabili tra cui l'età in quanto aumenta l'incidenza in relazione all'invecchiamento, il sesso maschile considerando che gli uomini hanno un rischio più elevato di sviluppare la patologia, l'origine etnica, la storia familiare e la predisposizione genetica [12].

Agendo per un periodo di tempo prolungato tutti questi fattori creano un ambiente infiammatorio locale che favorisce l'insorgenza e poi la progressione del cancro. Questo microambiente tumorale presenta una complessa eterogeneità fenotipica e molecolare [6].

1.2.3 Carcinogenesi e lesioni precancerose

La carcinogenesi gastrica è un processo multi-step che comporta, nella maggior parte dei casi, un cambiamento della normale mucosa dello stomaco attraverso il susseguirsi di vari eventi: inizialmente si ha un'inflammazione cronica della mucosa gastrica, definita gastrite, con sua successiva atrofia e una metaplasia intestinale in cui si verifica la sostituzione dell'epitelio gastrico con quello intestinale fino ad arrivare a una condizione di displasia, una neoplasia intraepiteliale, e infine di carcinoma infiltrante. Questi eventi possono verificarsi nell'arco di diversi anni [13].

Le lesioni precancerose sono quindi rappresentate dalla gastrite cronica atrofica e dalla metaplasia intestinale, le quali rappresentano le due condizioni base per lo sviluppo della displasia e successivamente dell'adenocarcinoma.

La gastrite cronica è una lesione preneoplastica asintomatica caratterizzata dalla lenta sostituzione delle strutture ghiandolari gastriche con tessuto connettivo la cui causa principale è identificabile nelle infezioni croniche da *H. pylori* o reazioni di autoimmunità. Nel momento in cui vengono identificate le caratteristiche endoscopiche della gastrite atrofica è necessario eseguire una biopsia per la conferma istopatologica e la quantificazione del rischio di evoluzione in adenocarcinoma gastrico [11].

La metaplasia intestinale è definita invece come la comparsa di un epitelio intestinale in sostituzione del normale epitelio dello stomaco e può essere classificata come completa se mostra cellule caliciformi, enterociti assorbenti con orlo luminale a spazzola ed espressione di mucina intestinale (MUC2) o incompleta se presenta cellule globose, cellule assorbenti senza bordo a spazzola e co-espressione di mucine intestinali e gastriche (MUC5AC, MUC6). L'estensione della metaplasia intestinale e il grado della metaplasia intestinale di tipo incompleto sono affidabili indicatori utilizzabili per indicare il rischio di sviluppare il cancro gastrico [11], [13].

La displasia gastrica rappresenta il penultimo stadio della sequenza della carcinogenesi gastrica rappresentante un'alterazione neoplastica inequivocabile dell'epitelio gastrico. Si tratta di una condizione che può insorgere come lesione de novo o verificarsi all'interno di polipi sporadici benigni preesistenti. Per la displasia esistono dei criteri diagnostici che si basano sulla presenza di atipie cellulari, differenziazione anomala, disorganizzazione architetturale e aumento dell'attività mitotica e ne consentono la classificazione in basso o alto grado di displasia [13].

1.2.4 Presentazione clinica

Al momento della diagnosi sulla base dello stadio in cui la patologia viene rilevata si può classificare il carcinoma gastrico come: cancro in fase iniziale ("early gastric cancer", EGC) e cancro in stadio tardivo ("advanced gastric cancer", AGC). L'early gastric cancer è una neoplasia limitata alla mucosa o sottomucosa indipendentemente dalla dimensione del tumore o dalla presenza di metastasi ai linfonodi [14], [15] ed è associata a una prognosi eccellente se trattato chirurgicamente [11]. Quando la neoplasia gastrica si estende oltre la tonaca muscolare o negli organi vicini dando origine a metastasi viene definita come advanced gastric cancer. Il cancro allo stomaco spesso viene diagnosticato in fase avanzata e ha generalmente una prognosi sfavorevole [15].

L'early gastric cancer risulta nella maggior parte dei casi asintomatico, mentre nell'advanced gastric cancer i sintomi includono: disfagia, astenia, indigestione, vomito, perdita di peso e rapida sensazione di sazietà quando si mangia. Tuttavia, in molti casi questi sintomi aspecifici non portano ad indagini urgenti e pertanto viene ulteriormente ritardata la diagnosi [16].

1.2.5 Classificazione istopatologica e molecolare

I due tradizionali sistemi di classificazione dell'adenocarcinoma gastrico sono basati sulla morfologia e sono rappresentati dalla classificazione di Lauren e dell'OMS. Tuttavia, tali sistemi non incorporano i progressi relativi agli aspetti molecolari e genetici della patologia e di conseguenza non forniscono indicazioni specifiche relative al trattamento. Il Cancer Genome Atlas propone pertanto una classificazione basata sull'aspetto molecolare dell'adenocarcinoma gastrico [17] che può essere considerata come la base per mettere a punto nuove strategie terapeutiche [18].

La classificazione di Lauren propone la suddivisione dell'adenocarcinoma gastrico in quattro tipologie:

- Intestinale;
- Diffuso;
- Misto;
- Indeterminato [13].

Le due tipologie principali di carcinoma gastrico secondo questa classificazione sono rappresentate dal sottotipo intestinale e dal diffuso che si differenziano per le diverse caratteristiche patologiche, epidemiologiche ed eziologiche. Nel fenotipo intestinale le cellule tumorali mostrano adesione, sono disposte in formazioni tubulari o ghiandolari e spesso sono associate a metaplasia intestinale. Questa tipologia di tumore gastrico si verifica più comunemente nei pazienti anziani di sesso maschile, nei quali è affetto l'antro gastrico, presentando un decorso più lungo e una prognosi migliore. Al suo sviluppo si associa l'infezione da *H. pylori* insieme a fattori ambientali e dietetici. Al contrario, nel sottotipo diffuso le cellule tumorali non aderiscono tra loro e si infiltrano nello stroma come singole cellule o piccoli gruppi di cellule dando origine a una popolazione di cellule tumorali sparse e non coese. È associato a pazienti di giovane età, di sesso femminile con presenza di gastriti [19]. I tumori che presentano sia componenti intestinali che diffuse sono chiamati carcinomi misti e hanno una prognosi peggiore rispetto ai due sottotipi considerati singolarmente. Infine, i carcinomi solidi, scarsamente differenziati o indifferenziati che non rientrano in nessuno di questi sottotipi vengono inseriti nella categoria indeterminata [13].

La classificazione dell'OMS raggruppa invece gli adenocarcinomi gastrici in cinque categorie:

- Adenocarcinoma tubulare;
- Adenocarcinoma papillare;
- Adenocarcinoma mucinoso;
- Adenocarcinoma scarsamente coeso;
- Adenocarcinoma rari come il carcinoma micropapillare, l'adenocarcinoma gastrico di tipo ghiandola fundica e il gastroblastoma.

L'adenocarcinoma tubulare è composto da strutture tubulari, ghiandolari o acinose di diametro variabile e con diverso grado di differenziazione mentre un'architettura papillare digitiforme è presente nel carcinoma papillare e se questa risulta essere mescolata a strutture ghiandolari costituisce un ulteriore fenotipo definibile come “tubulo-papillare”. L'adenocarcinoma mucinoso è, invece, caratterizzato dalla produzione e presenza di mucina in un quantitativo superiore al 50% del tumore. Infine, il carcinoma scarsamente coeso è composto da cellule tumorali isolate o disposte in piccoli cluster privi di coesione cellulare [13]. A partire dalla quarta edizione della classificazione dell'OMS nella categoria dell'adenocarcinoma scarsamente coeso è stato incluso l'adenocarcinoma ad anello a castone definito anche come “signet-ring cell” che fino a quel momento era stato considerato come una tipologia indipendente. I carcinomi tubulari e papillari corrispondono approssimativamente ai tumori gastrici di tipo intestinale, mentre i carcinomi scarsamente coesi corrispondono al sottotipo diffuso secondo la classificazione di Lauren [20].

L'OMS fornisce anche indicazioni circa il grado di differenziazione che rappresenta un importante parametro per valutare l'aggressività dei tumori gastrici. Il sistema utilizzato permette di differenziare gli adenocarcinomi che hanno un basso grado di differenziazione da quelli di alto grado [21]. I carcinomi gastrici di basso grado sono moderatamente o ben differenziati mentre quelli di alto grado sono scarsamente differenziati [20].

Infine, il Cancer Genome Atlas attraverso un'analisi genomica ha proposto una classificazione degli adenocarcinomi che comprende quattro sottotipi molecolari:

- I tumori che mostrano un'instabilità dei microsatelliti;
- I tumori positivi al virus di Epstein-Barr;
- I tumori che mostrano un'instabilità cromosomica;
- I tumori geneticamente stabili [18].

I tumori gastrici con un'instabilità dei microsatelliti sono caratterizzati da un elevato tasso mutazionale dovuto a un difetto nel funzionamento del sistema “mismatch repair” che, in condizioni normali, ha il compito di riparare gli errori che avvengono durante la replicazione del DNA. Spesso, infatti, è la proteina del mismatch repair 1 (MLH1) ad essere silente in questo tipo di tumori [22]. Valutare l'instabilità dei microsatelliti è quindi importante per i pazienti perché è

considerata un fattore predittivo di risposta a terapia. Inoltre, questi tumori solitamente esprimono anche molecole del checkpoint immunitario come PD-L1 che lo rendono idoneo al trattamento con l'immunoterapia.

I tumori associati al virus di Epstein-Barr rappresentano una piccola percentuale degli adenocarcinomi gastrici. Dal punto di vista istologico possono mostrare una differenziazione tubulare e intestinale con spesso un denso infiltrato di linfociti che si presenta come un fenotipo indifferenziato. Allo stesso modo dei tumori con un'instabilità dei microsatelliti, possono esprimere PD-L1 e quindi rispondere agli inibitori dei checkpoint immunitari.

Negli adenocarcinomi gastrici con presenza dell'instabilità cromosomica si evidenzia un'eterogeneità intra-tumorale che contribuisce a rendere il microambiente tumorale favorevole alla continua evoluzione delle popolazioni di cellule tumorali e di conseguenza all'instaurarsi del fenomeno della resistenza. Una delle caratteristiche principali di questi tumori è la presenza della mutazione a livello del gene che codifica per la proteina tumorale P53. Sono frequenti anche le amplificazioni nei geni HER2 (recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano), TGF α 2 (recettore del fattore di crescita dei fibroblasti), EGFR (recettore del fattore di crescita epidermico) e MET (recettore del fattore di crescita degli epatociti). Secondo la classificazione di Lauren mostrano un fenotipo di tipo intestinale.

I tumori gastrici geneticamente stabili sono caratterizzati da un fenotipo istologico diffuso secondo la classificazione di Lauren. Presentano spesso mutazioni nel gene CDH1 e RHOA e mostrano riarrangiamenti tra CLDN18 e ARHGAP26 o ARHGAP6 [18].

1.2.6 Diagnosi

La diagnosi di adenocarcinoma gastrico è importante e fondamentale per ciascun paziente per stabilire non solo la presenza della patologia, ma anche le caratteristiche proprie del tumore quali l'aspetto morfologico, la stadiazione o il pattern di espressione molecolare in modo tale che si possa scegliere il trattamento più efficace possibile [8].

Il referto diagnostico di adenocarcinoma gastrico viene redatto dall'Anatomo Patologo a partire da campioni biotici che sono stati prelevati attraverso gastroscopia [14]. Il referto istopatologico include la diagnosi istologica che permette la classificazione del tumore secondo l'aspetto morfologico e le informazioni necessarie per stabilire la stadiazione come l'invasione tumorale e il grado patologico di differenziazione [8].

Nei pazienti di nuova diagnosi si raccomanda inoltre l'esecuzione del test universale per l'instabilità dei microsatelliti mediante PCR/Sequenziamento di Nuova Generazione (NGS) o per i deficit nel sistema "mismatch repair" mediante immunoistochimica. Inoltre, nei casi in cui si

sospetta una malattia in stadio avanzato o metastatico sono raccomandati i test per valutare l'espressione di HER-2, PD-L1 (ligando di morte cellulare programmata 1) e CLAUDIN18.2 (proteina Claudina 18 isoforma 2). Le linee guida suggeriscono infine di effettuare uno screening per identificare la presenza di una storia familiare di cancro allo stomaco e nei casi in cui è necessario valutare la presenza di *H. pylori* [8].

1.2.7 Fattori prognostici

Per definire con precisione la prognosi del cancro gastrico è fondamentale, al momento della diagnosi, un'accurata stadiazione (TNM) che viene definita in base alla profondità dell'invasione tumorale (T), al coinvolgimento dei linfonodi (N) e alla presenza di metastasi (M) [4].

I tumori gastrici precoci hanno una prognosi migliore rispetto ai tumori in stadio avanzato con un tasso di sopravvivenza superiore al 90% a cinque anni dalla resezione chirurgica. Se però questi tumori non vengono trattati si stima che il 63% di essi progredisce verso uno stadio avanzato entro i successivi cinque anni. Nel momento in cui il tumore oltre che in stadio avanzato si presenta come inoperabile la prognosi a quel punto risulta essere infausta con una sopravvivenza prevista di soli pochi mesi [13].

1.2.8 Terapia

Per scegliere la corretta strategia terapeutica e definire la sua efficacia è fondamentale la stadiazione completa (TNM). In generale, sono diverse le possibilità di trattamento esistenti per i tumori considerati in stadio precoce rispetto a quelli in stadio avanzato e non operabili.

I pazienti con adenocarcinoma gastrico in stadio iniziale devono essere trattati con una resezione endoscopica e quando questo non è sufficiente con un intervento chirurgico [23]. I trattamenti endoscopici raccomandati per questo tipo di lesione sono due: la resezione endoscopica della mucosa e la dissezione endoscopica della sottomucosa. Nel momento in cui il paziente soddisfa i criteri per la terapia endoscopica i fattori che guidano il medico nella scelta della metodica più accurata sono il tipo istopatologico, la dimensione della lesione, la profondità dell'invasione e la presenza di ulcerazioni. Quando invece la resezione endoscopica non è un'opzione praticabile il soggetto deve essere indirizzato verso l'intervento chirurgico.

Nel corso degli anni per questi tumori in stadio iniziale sono stati ideati nuovi approcci minimamente invasivi e opzioni di trattamento personalizzate che offrono un esito oncologico favorevole a lungo termine e una buona qualità della vita [11].

La chirurgia e la chemio-radioterapia rappresentano le opzioni di trattamento disponibili per il cancro gastrico in stadio avanzato. In particolare, in questi casi la chemioterapia neoadiuvante preoperatoria e la combinazione della chemioterapia e della radioterapia rappresentano l'approccio più corretto da scegliere [13]. Tuttavia, non esiste uno standard su come scegliere gli agenti da utilizzare per la chemioterapia neoadiuvante per cui la decisione viene principalmente presa in base ai risultati della tomografia computerizzata, delle tecniche radiologiche che utilizzano il bario, sull'accuratezza del gastroscopio e la stadiazione. L'applicazione di questa terapia può ridurre significativamente la stadiazione del tumore, aumentare il tasso di successo chirurgico e prolungare il tempo di sopravvivenza del paziente [15].

Ulteriormente diversa è la gestione dell'adenocarcinoma gastrico non resecabile o metastatico per cui la chirurgia non è una possibilità praticabile e che quindi viene trattato con una terapia sistemica volta ad alleviare i sintomi, a prolungare la sopravvivenza ritardando la progressione tumorale e a migliorare la qualità della vita del paziente [8].

2. Obiettivo

L'elaborato è stato condotto prendendo in esame i casi relativi ad adenocarcinoma gastrico pervenuti e refertati presso il servizio di Anatomia patologica della Clinica Santa Rita di Vercelli dal 2 Giugno 2025 al 30 Gennaio 2026.

L'obiettivo del lavoro è stato porre l'attenzione sull'importanza dell'individualizzazione dei marcatori molecolari fondamentali per la valutazione prognostica e predittiva di risposta a terapie bersaglio. In seguito all'osservazione microscopica del campione vengono analizzati i fattori di rischio e la classificazione istopatologia e molecolare, con particolare attenzione ad HER-2, il principale marcatore che viene testato di routine sui campioni tissutali di adenocarcinoma gastrico, mentre su richiesta specifica dell'oncologo, in alcuni casi, può essere rilevante testare anche PD-L1 e l'instabilità dei microsatelliti.

Considerando la rilevanza di questi test, negli ultimi anni la ricerca si è focalizzata sulla scoperta di nuovi marcatori molecolari, tra cui CLAUDIN18.2 e FGFR2b, con lo scopo di fornire nuove possibilità terapeutiche.

3. Materiali e metodi

I casi in esame sono stati revisionati sulla piattaforma di archivio dati del servizio di Anatomia Patologica attraverso il criterio morfologico “adenocarcinoma, NAS” per il periodo compreso tra Gennaio 2023 e Dicembre 2025. Di tutti i risultati ottenuti sono stati selezionati solamente i casi relativi ad adenocarcinomi localizzati a livello dello stomaco.

3.1 Dal campione al vetrino

I campioni fissati in formalina pervenuti presso il servizio di Anatomia Patologica vengono ridotti e successivamente processati per una lenta disidratazione dei tessuti. Lo step seguente consiste nell’inclusione in paraffina e poi nel taglio al microtomo per ottenere le fette, trasparenti non colorate, da adagiare sul vetrino. Infine, si esegue un passaggio di reidratazione per poter poi procedere con la colorazione della fetta ottenuta e per quest'ultimo passaggio si utilizza principalmente la colorazione con ematossilina ed eosina.

3.2 Analisi morfologica

I vetrini colorati in ematossilina ed eosina sono stati osservati al microscopio ottico per identificare la morfologia dei campioni presi in esame nel corso di questo lavoro.

I sistemi di classificazioni basati sulla morfologia dell’adenocarcinoma gastrico che vengono utilizzati sono la classificazione di Lauren e dell’OMS.

3.3 Analisi immunoistochimica

L’immunoistochimica è una metodica di laboratorio che consiste in un insieme di tecniche e metodi che utilizzano degli anticorpi per identificare la presenza di antigeni specifici all’interno di sezioni di tessuto. Attraverso l’osservazione del vetrino al microscopio si ha la valutazione indiretta della reazione antigene-anticorpo. Pertanto, l’immunoistochimica è una tecnica indispensabile per rilevare su campione istologico la presenza di determinati antigeni caratteristici di determinate patologie neoplastiche.

Nel servizio di Anatomia Patologica è in uso il sistema di colorazione avanzata Ventana BenchMark ULTRA di Roche. Questo immunocoloratore serve a colorare automaticamente, su vetrini per microscopio, i campioni istologici con immunoistochimica specifica.

I campioni biotici precedentemente processati e montati sul vetrino vengono inseriti nell'immunocoloratore per essere colorati. La colorazione avviene in vari step: sparaffinatura, incubazione con anticorpo primario, aggiunta di anticorpo secondario o sistema di rilevazione, controcolorazione e infine montaggio del vetrino. In questo studio il sistema di colorazione utilizza come sistema di rilevazione l'OptiView DAB IHC Detection Kit che genera un segnale marrone.



Figura 5 - Immunocoloratore Ventana BenchMark ULTRA di Roche

Gli anticorpi utilizzabili nel presente lavoro sono:

- Ventana anti-HER2 (clone 4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody;
- Ventana Anti-Pan Keratin (clone AE1/AE3/PCK26) Primary Antibody;
- Ventana Cytokeratin 8 & 18 (clone B22.1 & B23.1) Mouse Monoclonal Antibody;
- Ventana anti-Cytokeratin 7 (clone SP52) Rabbit Monoclonal Primary Antibody;
- Ventana CEA (clone CEA31) Mouse Monoclonal Antibody;
- Ventana PD-L1 (clone SP263) Assay;
- Ventana anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody;
- Ventana anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody;
- Ventana anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody;
- Ventana anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

3.3.1 Ventana anti-HER2 (clone 4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

Ventana anti-HER2 (clone 4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody contiene un anticorpo monoclonale di coniglio diretto contro il dominio interno del recettore del fattore di crescita epidermico 2 umano (HER2, Epidermal Growth Factor Receptor 2). HER2, noto anche come CerbB2 o ERBB2, è una glicoproteina transmembrana con attività tirosin-chinasica coinvolta nei percorsi di trasduzione del segnale che portano alla crescita e alla differenziazione cellulare.

Diversi tipi di tumori maligni di origine epiteliale mostrano una sovraespressione della proteina HER2 e/o un'amplificazione del gene che codifica per questa proteina. In particolare, nel carcinoma gastrico tale amplificazione e sovraespressione sono associate a una prognosi peggiore. L'analisi con Ventana HER2 (4B5) nel carcinoma gastrico produce due tipi di colorazione. Una di membrana che si deve al fatto che HER2 è espressa a livello delle membrane cellulari sia dei tessuti normali che neoplastici e una colorazione citoplasmatica della mucosa gastrica principalmente normale. Pertanto, ai fini della determinazione della sovraespressione della proteina HER2, si prende in considerazione solo la colorazione di membrana che è indicativa di positività HER2 nelle cellule neoplastiche.

Per l'interpretazione dell'espressione di HER2 si utilizza un algoritmo di valutazione che si basa su pattern di colorazione. Quando il segnale dato dalla presenza di HER2 ha una distribuzione eterogenea si fa una stima visiva delle percentuali di cellule che mostrano una colorazione alle diverse intensità del segnale che viene impiegata per generare il punteggio di positività o negatività. Questo punteggio dipende dalla tipologia di campione esaminato, con conseguenti differenze tra campione da resezione e campione da biopsia.

I campioni di resezioni HER2 positivi sono definiti da più del 10% di cellule tumorali che mostrano un'intensità di immunocolorazione basolaterale classificata come 2+ o 3+ (forte colorazione). Nei campioni biotici, invece, il limite è fissato a più del 5% di cellule tumorali adiacenti che mostrano una colorazione da debole a moderata (2+) o intensa (3+).

L'algoritmo di valutazione per l'analisi Ventana HER2 (4B5) è riportato in figura 6.

Pattern di colorazione (campione da resezione)	Pattern di colorazione (campione da biopsia)	Punteggio (segnalare al medico curante)
Nessuna reattività o reattività di membrana in percentuale < 10% delle cellule tumorali	Nessuna reattività o reattività di membrana in qualsiasi cellula tumorale	0
Reattività di membrana fiavole/appena percettibile in percentuale $\geq$ 10% delle cellule tumorali; le cellule sono reattive solo in parte della rispettiva membrana	Cluster di cellule tumorali* con reattività di membrana fiavole/appena percettibile indipendentemente dalla percentuale di cellule tumorali colorate	1+
Reattività di membrana basolaterale o laterale completa, da debole a moderata in percentuale $\geq$ 10% delle cellule tumorali	Cluster di cellule tumorali* con reattività di membrana basolaterale o laterale completa, da debole a moderata indipendentemente dalla percentuale di cellule tumorali colorate	2+
Reattività di membrana basolaterale o laterale completa intensa in percentuale $\geq$ 10% delle cellule tumorali	Cluster di cellule tumorali* con reattività di membrana basolaterale o laterale completa intensa indipendentemente dalla percentuale di cellule tumorali colorate	3+

* $\geq$ 5 cellule coesive

Figura 6 - Algoritmo di valutazione HER2 per il carcinoma gastrico

La determinazione dello stato HER2 è fondamentale per identificare e selezionare i pazienti che potrebbero trarre beneficio dal trattamento con terapia HER2 mirata.

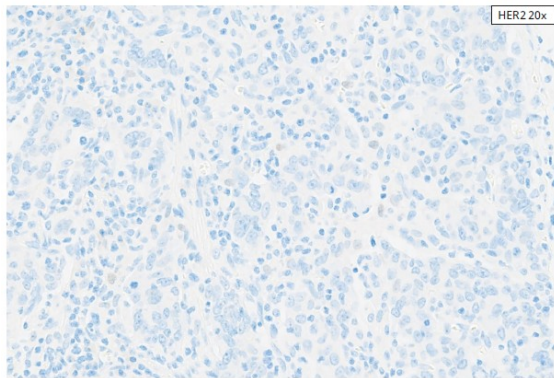


Figura 7 - Immunoistochimica her-2: score 0

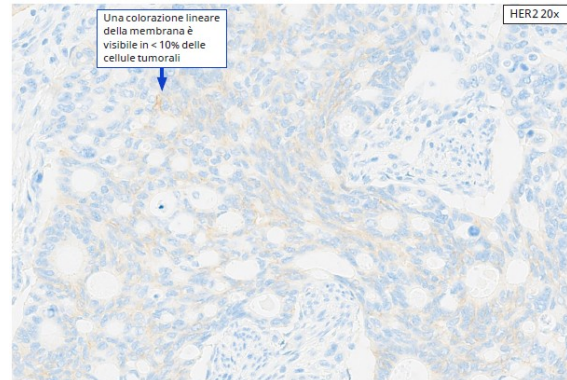


Figura 8 - Immunoistochimica her-2: score 1+

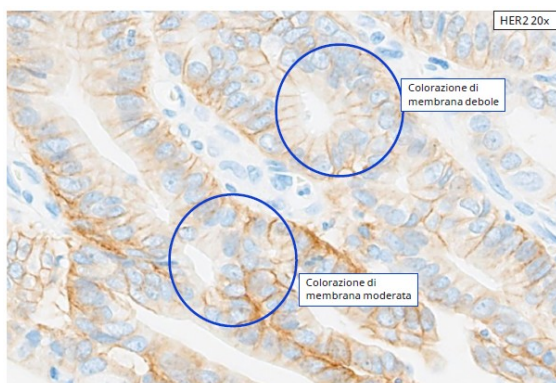


Figura 9 - Immunoistochimica her-2: score 2+

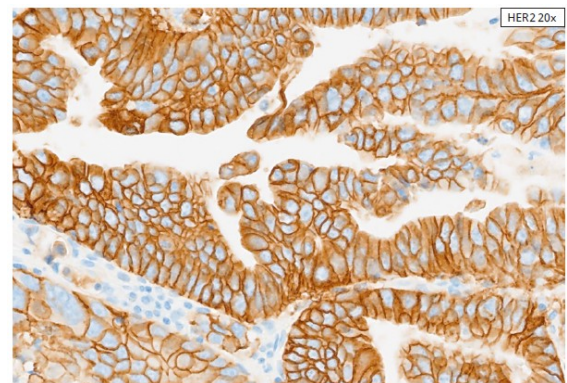


Figura 10 - Immunoistochimica her-2: score 3+

3.3.2 Ventana Anti-Pan Keratin, Cytokeratin 8 & 18, anti-Cytokeratin 7 e CEA

Come ausilio nel riconoscimento delle neoplasie di origine epiteliale è possibile utilizzare l'anticorpo Anti-Pan Keratin costituito da un insieme di tre cloni di anticorpi monoclonali: AE1, AE3 e PCK26 che riconoscono la maggior parte delle citocheratine (CK) sia acide che basiche. La combinazione di questi cloni permette di ottenere un singolo reagente con un ampio spettro di reattività nei confronti delle CK che consente quindi di rilevare la maggior parte dei casi di carcinoma. In aggiunta si possono usare anche sistemi per la ricerca di CK specifiche. Per esempio, l'anticorpo anti-CK 8/18 (clone B22.1 & B23.1) è impiegato per rilevare la presenza delle CK 8 e 18 che sono i principali componenti dei filamenti intermedi nella maggior parte degli epiteli semplici incluso quelli del tratto gastrointestinale. CK 8 e 18 sono infatti utilizzate come marcatori epiteliali per identificare diverse patologie, tra cui i carcinomi metastatici gastrici. L'anti-CK7 (clone SP52) Rabbit Monoclonal Primary Antibody, invece, rileva la CK7 che è espressa a livello dell'epitelio di molti organi quali lo stomaco, il polmone, la mammella, l'utero, l'ovaio, il pancreas, la tiroide e la vescica.

In alcuni casi, oltre alla colorazione con gli anticorpi per le citocheratine, è stato utilizzato l'anticorpo anti-CEA (clone CEA31) rivolto contro l'antigene carcino-embriionario (CEA), una proteina che per il suo ruolo di molecola di adesione cellulare promuove lo sviluppo del tumore. Pertanto, la positività anti-CEA si riscontra in adenocarcinomi di varia origine.

3.3.3 Ventana PD-L1 (clone SP263)

Ventana PD-L1 (SP263) Assay utilizza un anticorpo primario monoclonale di coniglio anti-PD-L1 per riconoscere il ligando di morte cellulare programmata 1 (PD-L1, Programmed Death-Ligand 1).

PD-L1 è una proteina transmembrana espressa in cellule immunitarie che regola negativamente le risposte del sistema immunitario legandosi al suo recettore PD-1 (Programmed Death-1) espresso sulla superficie dei linfociti T. In particolare, il legame PD-1/PD-L1 rappresenta un blocco critico del checkpoint immunitario che influisce negativamente sulla funzione e proliferazione delle cellule T.

Le cellule tumorali possono esprimere PD-L1 e sfruttare il legame PD-1/PD-L1 per facilitare l'evasione immunitaria, favorire la crescita e la sopravvivenza del tumore stesso. Pertanto, il blocco di questa via PD-L1/PD-1 rappresenta un possibile bersaglio terapeutico con farmaci inibitori del checkpoint immunitario.

L'espressione di PD-L1 in pazienti con tumore allo stomaco viene valutata utilizzando il "combined positive score" (CPS) e il "tumor positive score" (TPS) [24]. Il CPS viene calcolato dividendo il numero di cellule PD-L1 positive (cellule tumorali, linfociti e macrofagi) e il numero di cellule tumorali vitali, mentre il TPS è la percentuale di cellule tumorali positive nell'area neoplastica [25]. Un tumore viene definito CPS positivo con un valore >1 e TPS positivo con un valore $>1\%$. Siccome esistono vari cut-off che è possibile utilizzare nella selezione dei pazienti idonei al trattamento con approcci di immunoterapia, si deve indicare se il campione è positivo, il numero assoluto del CPS/TPS o il range di valori in cui esso ricade (esempio 1-4, 5-9 e ≥ 10 oppure $<1\%$ e $\geq 1\%$) [26]. Più recentemente per un'ulteriore selezione dei pazienti è stato introdotto anche il punteggio di positività dell'area tumorale (TAP) calcolato dividendo l'area coperta da cellule tumorali e immunitarie positive a PD-L1 e l'area tumorale totale [25].

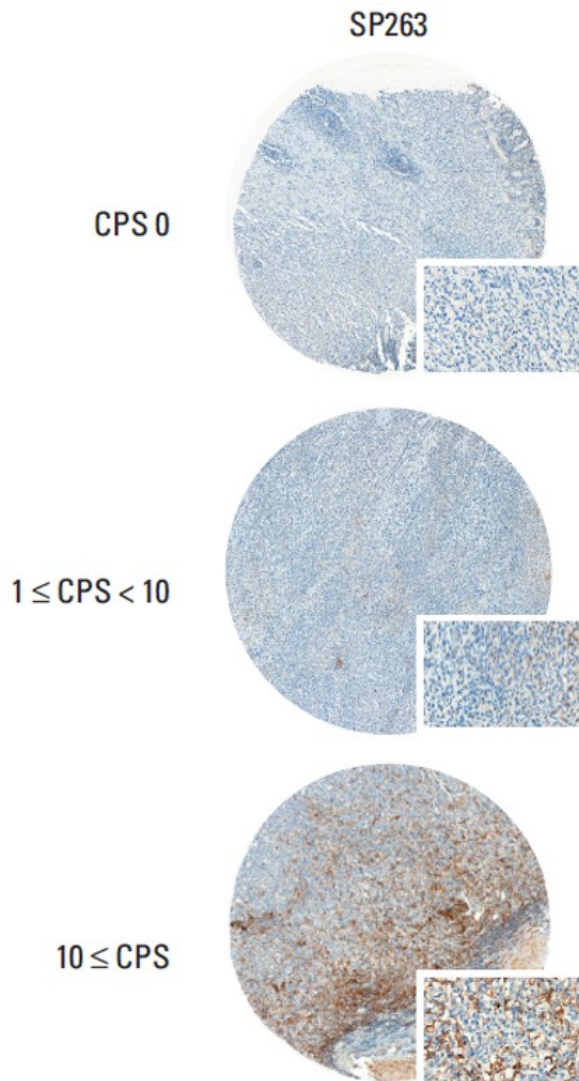


Figura 11 - Rappresentazione secondo lo score CPS del tumore gastrico colorato con PD-L1 SP263

3.3.4 Ventana anti-MLH1, Ventana anti-PMS2, Ventana anti-MSH2 e Ventana anti-MSH6

È possibile, tramite indagine immunoistochimica, valutare l'espressione delle quattro proteine del mismatch repair (MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6) coinvolte nel sistema di riparo del DNA (MMR). Ciò consente l'identificazione dei tumori gastrici con un deficit delle proteine del MMR (tumori mismatch repair deficient o dMMR) caratterizzati da un'instabilità dei microsatelliti (MSI).

Le proteine MLH1 e PMS2 normalmente funzionano insieme in un complesso eterodimerico, così come le proteine MSH2 e MSH6. In particolare, quando l'MMR funziona correttamente l'eterodimero MSH6-MSH2 si lega al DNA nella regione da riparare inducendo un cambiamento

conformazionale che consente, a sua volta, all'eterodimero MLH1-PMS2 di legarsi operando così la riparazione per escissione del DNA interessato. Mutazioni o carenze in queste proteine determinano frequenti instabilità dei microsatelliti e mutazioni somatiche dovute proprio a errori che avvengono durante la replicazione del DNA.

Gli anticorpi utilizzati nell'identificazione delle proteine del mismatch repair sono:

- Ventana anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody che viene adoperato per l'identificazione della proteina MLH1 del sistema MMR;
- Ventana anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody che serve per identificare la proteina PMS2 umana;
- Ventana anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody impiegato per l'identificazione della proteina MSH2 umana;
- Ventana anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody che serve per identificare qualitativamente la proteina MSH6;

Le quattro proteine del MMR sono espresse a livello del nucleo delle cellule proliferanti normali; pertanto, la loro assenza nei tumori solidi può aiutare nell'identificazione dei pazienti eleggibili a determinate immunoterapie.

Il pattern di colorazione cellulare per le proteine del MMR è di tipo nucleare. Pertanto, per ognuna delle quattro proteine si indica la sua espressione a livello di nucleo in quanto la perdita di tale espressione, per una o più proteine, permette di identificare la presenza di un deficit nel sistema mismatch repair.

4. Risultati

Nel presente lavoro sono stati estrapolati, mediante l'uso di un software di archivio dati, 18 casi di adenocarcinoma gastrico refertati presso il servizio di Anatomia Patologica della Clinica Santa Rita nel periodo compreso tra Gennaio 2023 e Dicembre 2025.

I casi di adenocarcinoma gastrico refertati sono i seguenti:

Casi	Età alla diagnosi	Sesso	Diagnosi
43/23	67	M	Adenocarcinoma di tipo “anello con castone”
763/23	75	M	Adenocarcinoma scarsamente differenziato del tipo ad “anello con castone”
948/23	73	M	Adenocarcinoma scarsamente differenziato
3980/23	56	M	Adenocarcinoma
4264/23	79	M	Adenocarcinoma del tipo ad “anello con castone”
4977/23	83	M	Adenocarcinoma scarsamente differenziato
5875/23	53	M	Adenocarcinoma del tipo ad “anello con castone”
6035/23	38	M	Adenocarcinoma di tipo intestinale
224/24	32	F	Adenocarcinoma del tipo ad “anello con castone”
1108/24	84	M	Adenocarcinoma di tipo intestinale
1153/24	71	F	Adenocarcinoma di tipo intestinale con aspetti mucinosi
2168/24	66	M	Adenocarcinoma di tipo diffuso
4235/24	61	M	Adenocarcinoma mucinoso
4949/24	59	F	Adenocarcinoma del tipo ad “anello con castone”
6297/24	77	M	Adenocarcinoma con aspetti papillari
6535/24	55	M	Adenocarcinoma di tipo intestinale

350/25	67	M	Adenocarcinoma di tipo intestinale
3068/25	76	M	Adenocarcinoma scarsamente coeso con componente a cellule ad anello con castone

Tabella 1 - Diagnosi di adenocarcinoma gastrico refertati nel periodo compreso tra Gennaio 2023 e Dicembre 2025 nel laboratorio di Anatomia Patologica della Clinica S. Rita

Dall'esecuzione di un'analisi sull'incidenza della neoplasia prendendo in considerazione le diverse fasce d'età (età inferiore ai 20 anni, età compresa tra i 20 e i 40 anni, età tra i 40 e i 50 anni, età tra i 50 e i 60 anni ed infine età sopra i 60) si può osservare come lo sviluppo e la diagnosi dell'adenocarcinoma gastrico siano più incidenti in età avanzata. Infatti, la maggior parte dei casi (12) si ritrovano nella fascia d'età oltre i 60 anni, dei restanti 4 sono nella fascia di età tra i 50 e i 60 anni e solamente 2 nella fascia d'età compresa tra i 20 e i 40 anni.

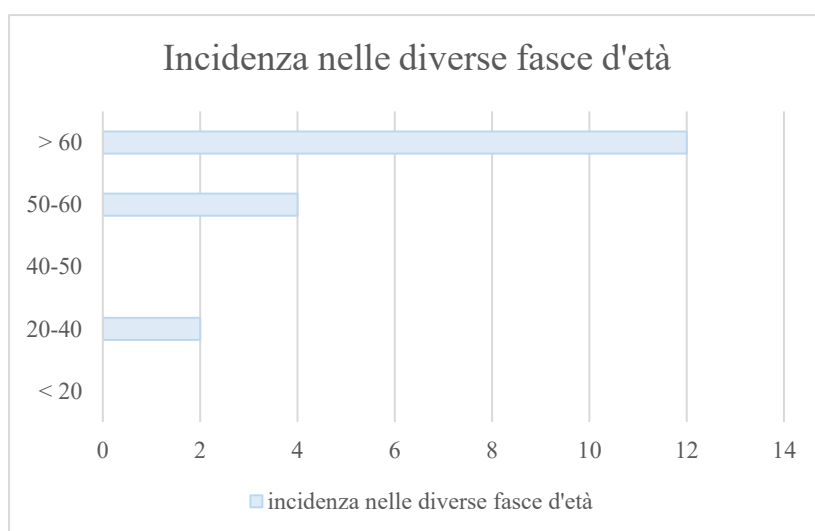


Grafico 1 - Incidenza dell'adenocarcinoma gastrico nelle diverse fasce d'età

Dal grafico 2, invece, si può osservare come dei 18 casi riportati solo 3 campioni appartenevano ad individui di sesso femminile e questo consente di mettere in evidenza come la patologia in esame abbia un'incidenza maggiore nella popolazione di sesso maschile.

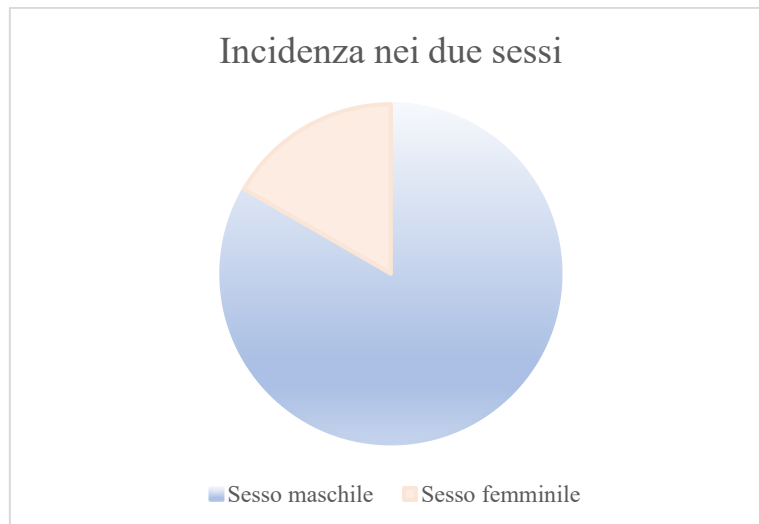


Grafico 2 - Incidenza dell'adenocarcinoma gastrico nei due sessi

4.1 Analisi casistica

CASO 1

Protocollo n° 43/23

Descrizione macroscopica

4 frammenti giallastri

Indagine immunoistochimica

- HER2-neu: score 0

Giudizio diagnostico

Tre frammenti di mucosa gastrica di tipo antrale e un frammento superficiale ed ulcerato riferibile ad adenocarcinoma gastrico del tipo ad “anello con castone” dello stomaco

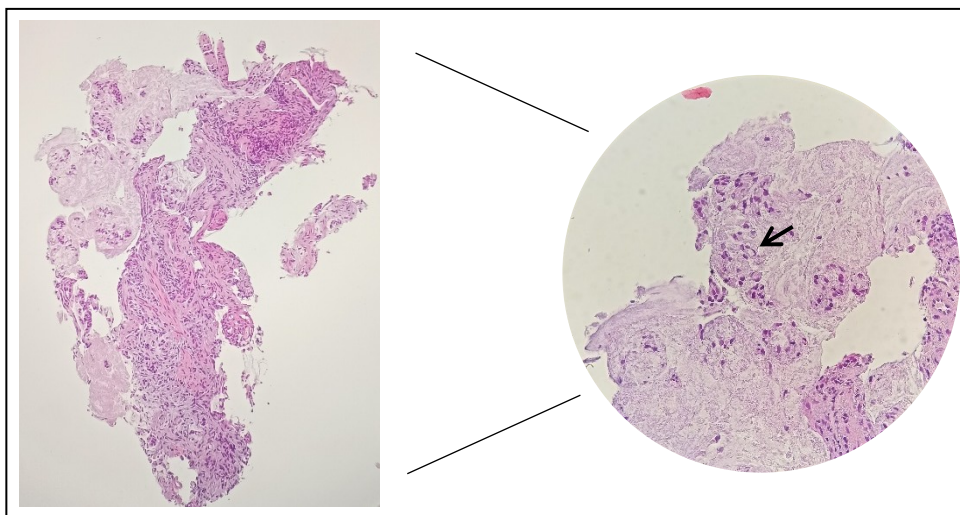


Figura 12 - Sezione di mucosa gastrica (Ematossilina-Eosina). A sinistra, a basso ingrandimento (**5x**), si osserva un frammento superficiale ulcerato con perdita della normale architettura della mucosa antrale e presenza di una popolazione cellulare atipica infiltrante lo stroma. A destra, ad alto ingrandimento (**20x**), si osserva la tipica morfologia dell'adenocarcinoma ad anello con castone: le cellule neoplastiche appaiono isolate o in piccoli aggregati, caratterizzate da un citoplasma ampiamente vacuolizzato che sposta il nucleo ipercromatico verso la periferia cellulare

CASO 2

Protocollo n° 763/23

Descrizione macroscopica

5 frammenti giallastri

Indagine immunoistochimica

- HER2-neu: 0
- CK7-, CK8/18+, CEA+ e p40-

Giudizio diagnostico

Due frammenti superficiali di mucosa gastrica normostrutturata e tre frammenti ulcerati di mucosa esofago-cardiale ed esofagea sede di adenocarcinoma scarsamente differenziato del tipo ad anello con castone

[si veda Figura 23 in Appendice]

CASO 3

Protocollo n° 948/23

Descrizione macroscopica

- a) Antro: un frammento giallastro
- b) Fondo/cardias: un frammento giallastro

Indagine immunoistochimica

- CK7+, CEA+ focale, p40-

Giudizio diagnostico

- a) Mucosa gastrica di tipo corpale sede di gastrite cronica attiva. Non evidente infezione da *H. pylori*
- b) Frammento ulcerato di adenocarcinoma scarsamente differenziato

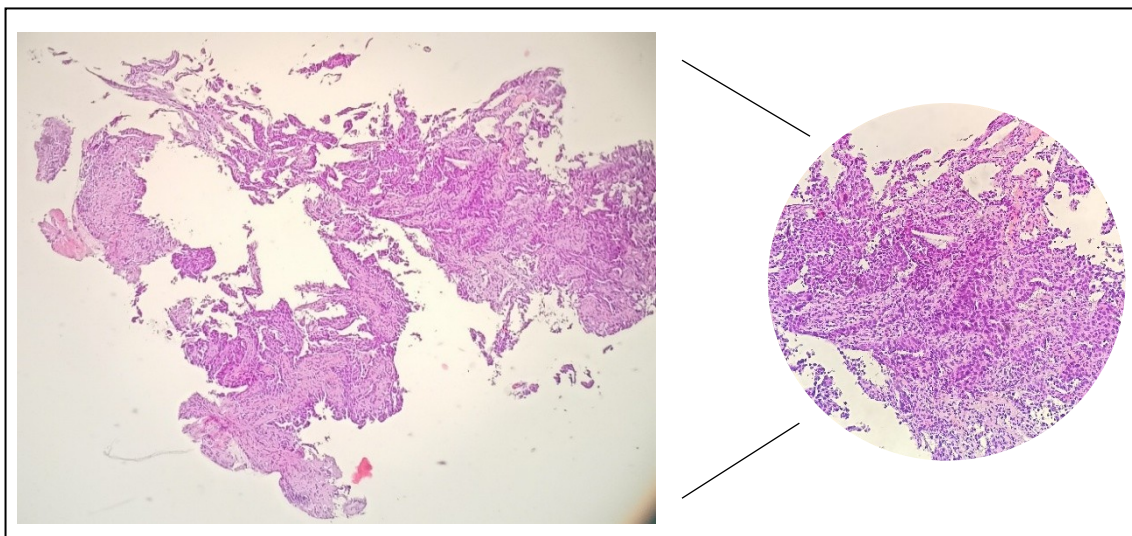


Figura 13 - Sezione di mucosa gastrica ulcerata (Ematossilina-Eosina). A sinistra, a basso ingrandimento (5x), si osserva la perdita dell'architettura ghiandolare normale, sostituita da una proliferazione neoplastica infiltrante. A destra, nel dettaglio a ingrandimento maggiore (20x), è possibile distinguere come le cellule tumorali non formino più strutture ghiandolari, ma si presentino ammassate in strutture compatte e solide (**laminae**) o in piccoli gruppi disordinati (**nidi**) che infiltrano lo stroma circostante

CASO 4

Protocollo n° 3980/23

Descrizione macroscopica

- a) Esofago-gastrico: 5 frammenti giallastri
- b) Antro: 2 frammenti giallastri

Indagine immunoistochimica

- CK7+, CK5/6-, p63-, CEA+

Giudizio diagnostico

- a) Frammenti superficiali di mucosa esofago-cardiale con foci ulcerati riferibili ad adenocarcinoma
- b) Mucosa gastrica di tipo antrale con aspetti di gastrite cronica atrofica quiescente con atrofia lieve e focale metaplastica enterica. Non evidenza di infezione da *H. pylori*

CASO 5

Protocollo n° 4264/23

Descrizione macroscopica

Alcuni frammenti grigiastri

Indagine immunoistochimica

- CK7+, CK8/18+

Giudizio diagnostico

Frammenti di essudato fibrino-leucocitario e di mucosa gastrica di tipo antrale in tre dei quali si riportano foci di adenocarcinoma con aspetto ad anello a castone

[si veda Figura 24, Figura 25 e Figura 26 in Appendice]

CASO 6

Protocollo n° 4977/23

Descrizione macroscopica

7 frammenti giallastri

Indagine immunoistochimica

- Nessuna

Giudizio diagnostico

Frammenti di adenocarcinoma scarsamente differenziato e ulcerato. È risultata negativa la ricerca di *H. pylori*

[si veda Figura 27 in Appendice]

CASO 7

Protocollo n° 5875/23

Descrizione macroscopica

- a) Antro: 2 frammenti giallastri
- b) Fondo: 1 frammento giallastro
- c) Corpo-grande curvatura: 2 frammenti giallastri
- d) Cardias: 3 frammenti giallastri

Indagine immunoistochimica

- CK5/6-, CK7+, PanK+

Giudizio diagnostico

a-b-c) Mucosa gastrica di tipo antro-corpale e fundica sede di gastrite cronica superficiale quiescente senza evidenza di infezione da *H. pylori*

d) Frammenti superficiali ed ulcerati di mucosa esofago-cardiale sede di adenocarcinoma del tipo ad anello con castone

[si veda Figura 28 in Appendice]

CASO 8

Protocollo n° 6035/23

Descrizione macroscopica

- a) Antro: 2 frammenti giallastri
- b) Fondo: 1 frammento giallastro
- c) Cardias (superiore anteriore): 2 frammenti giallastri
- d) Cardias (superiore laterale sinistra): 1 frammenti giallastri

Indagine immunoistochimica

- CK7+ focale, CK5/6-

Giudizio diagnostico

- a-b) Mucosa gastrica di tipo antro-corpale sede di gastrite cronica superficiale quiescente senza evidenza di infezione da *H. pylori*
- c) Frammenti minuti, superficiali ed ulcerati di mucosa esofago-cardiale sede di adenocarcinoma del tipo intestinale
- d) Frammenti di mucosa di tipo gastrico corpale sede di flogosi cronica aspecifica

CASO 9

Protocollo n° 224/24

Descrizione macroscopica

- a) Antro: 2 frammenti giallastri
- b) Corpo- grande curvatura: 2 minuti frammenti
- c) Corpo- piccola curva: 2 minutissimi frammenti
- d) Fondo gastrico (random): 4 frammenti giallastri

Indagine immunoistochimica

- HER2-neu: score 2+
- CK7+, CK20+ focale

Giudizio diagnostico

- a) Mucosa gastrica di tipo corpale sede di gastrite cronica superficiale quiescente con aspetti follicolari. Non evidenza di infezione da *H. pylori*
- b-c) Frammenti minuti e superficiali di mucosa gastrica con aspetti di flogosi cronica quiescente
- d) frammenti superficiali e ulcerati di mucosa di tipo gastrico caratterizzati dalla presenza di foci di adenocarcinoma di tipo ad anello con castone

[si veda Figura 29 in Appendice]

CASO 10

Protocollo n° 1108/24

Descrizione macroscopica

Segmento di stomaco con grande curva di cm 15 e piccola curva di cm 11 sede di lesione crateriforme a bordi ispessiti di cm 2.5 x 2.5, posta a ridosso della piccola curva, a cm 4.5 dal margine distale e a cm 5 dal margine prossimale. Dal grasso periviscerale si isolano 8 linfonodi.

1-2) Margini 3-4-5-6-7) Lesione 8-9) Linfonodi

Indagine immunoistochimica

- HER2-neu: score 0

Giudizio diagnostico

Adenocarcinoma gastrico di tipo intestinale

- Grado di differenziazione: G3
- La neoplasia infiltra la tonaca muscolare
- Invasione vascolare: presente
- Invasione perineurale: non visibile
- Infiltrato linfocitico peritumorale: presente
- La mucosa gastrica adiacente presenta diffusi aspetti di gastrite cronica atrofica attiva, con metaplasia intestinale
- Margini di resezione e linfonodi periviscerali: indenni da neoplasia

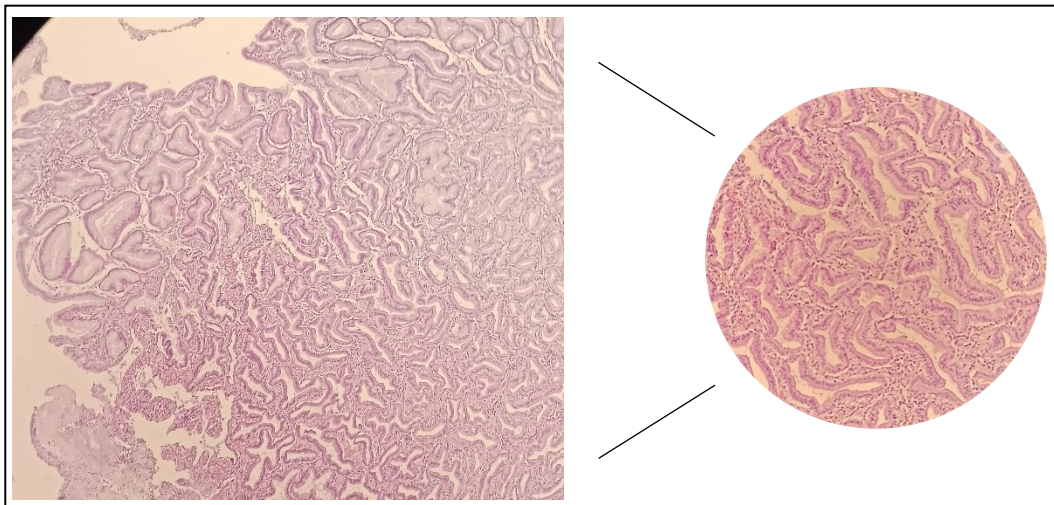


Figura 14 - Sezione di mucosa gastrica con adenocarcinoma di tipo intestinale (Ematossilina-Eosina). A sinistra, a basso ingrandimento (5x), si osserva la marcata distorsione dell'architettura mucosale, con ghiandole neoplastiche irregolari e ramificate che sostituiscono la struttura fisiologica infiltrando la lamina propria. A destra, nel dettaglio a ingrandimento maggiore (20x), è possibile distinguere come le cellule tumorali si organizzino in strutture ghiandolari atipiche e strettamente addossate tra loro (pattern back-to-back), caratterizzate da nuclei ipercromici, pleomorfismo e perdita della polarità cellulare

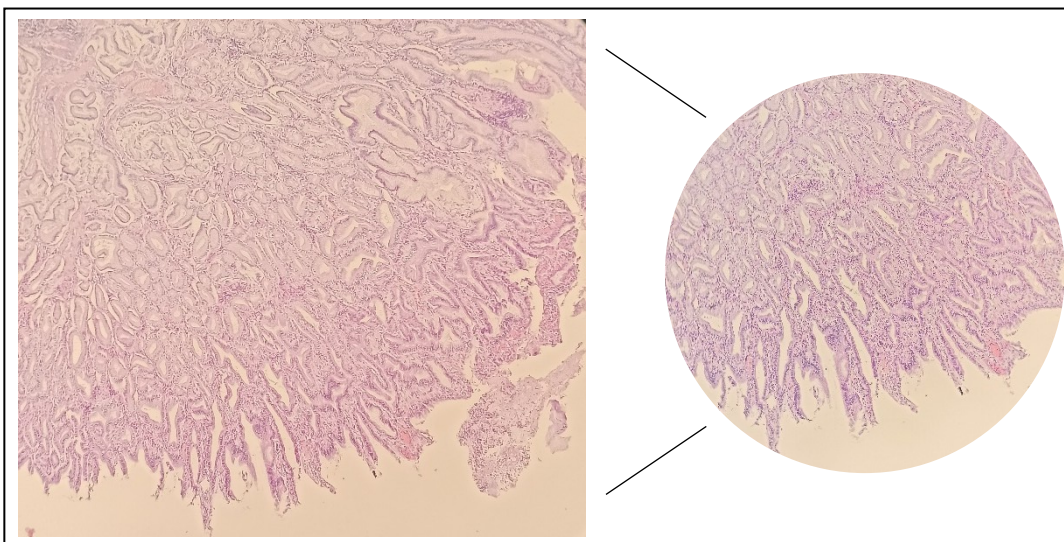


Figura 15 - Sezione di mucosa gastrica con adenocarcinoma di tipo intestinale (Ematossilina-Eosina). A sinistra, a basso ingrandimento (5x), è visibile un'area di forte crescita tumorale dove le ghiandole atipiche si espandono "a raggiera", occupando tutto lo spazio del tessuto circostante. A destra, nel dettaglio a ingrandimento maggiore (20x), si nota come le ghiandole perdano la loro forma regolare, apparendo frammentate e costituite da cellule con nuclei molto grandi e scuri, segno di un'elevata attività della neoplasia

CASO 11

Protocollo n° 1153/24

Descrizione macroscopica

7 frammenti giallastri

Indagine immunoistochimica

- HER2-neu: score 2+
- CK7+, CK20+

Giudizio diagnostico

Mucosa gastrica di tipo antrale sede di foci riferibili ad adenocarcinoma di tipo intestinale con aspetti mucinosi

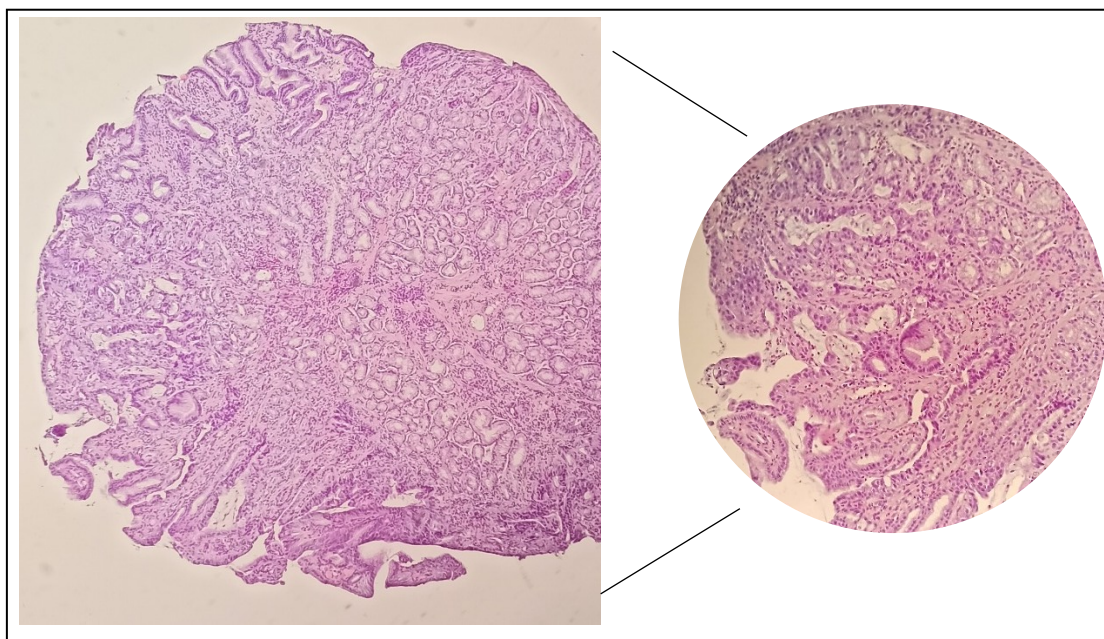


Figura 16 - Sezione di mucosa gastrica antrale con adenocarcinoma di tipo intestinale e aspetti mucinosi (Ematossilina-Eosina). A basso ingrandimento (5x), si osserva un frammento di mucosa antrale in cui la normale architettura è sovvertita da una proliferazione neoplastica ghiandolare. Nel dettaglio, a destra, a ingrandimento maggiore (10x), sono evidenti foci di adenocarcinoma di tipo intestinale caratterizzati da strutture ghiandolari irregolari che esibiscono aspetti mucinosi. Si nota la presenza di materiale mucoide sia all'interno dei lumi ghiandolari sia disperso nello stroma circostante

CASO 12

Protocollo n° 2168/24

Descrizione macroscopica

8 frammenti giallastri

Indagine immunoistochimica

- PanK+

Giudizio diagnostico

Frammenti superficiali ed estesamente necrotici di mucosa gastrica caratterizzati dalla presenza di foci di adenocarcinoma di tipo diffuso

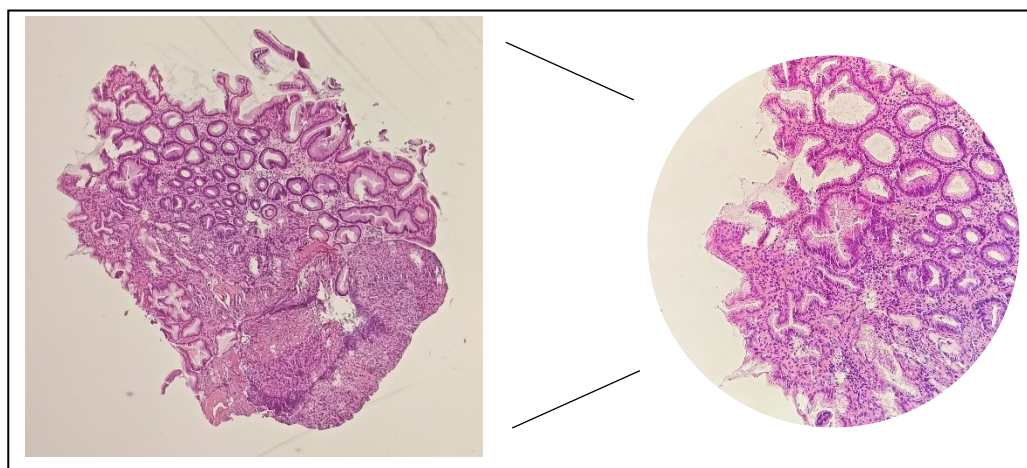


Figura 17 - Sezione di mucosa gastrica con adenocarcinoma di tipo diffuso (Ematossilina-Eosina). A basso ingrandimento (5x), si osserva un frammento superficiale di mucosa gastrica caratterizzato da un'estesa area di necrosi e da una marcata distorsione dell'architettura ghiandolare. Nel dettaglio, a maggiore ingrandimento (10x), sono evidenti foci di adenocarcinoma di tipo diffuso. Le cellule neoplastiche presentano un pattern di crescita dissociato, infiltrando lo stroma in modo isolato o in piccoli gruppi, con perdita della coesione intercellulare e dell'organizzazione ghiandolare

CASO 13

Protocollo n° 4235/24

Descrizione macroscopica

- a) Antro e angulus: 3 frammenti giallastri
- b) Corpo: 10 frammento giallastro

Indagine immunoistochimica

- HER2-neu: score 2+
- CEA+, CK7+, CK20+

Giudizio diagnostico

- a) Mucosa gastrica di tipo antrale sede di gastrite cronica superficiale quiescente. Non evidenza di infezione da *H. pylori*
- b) Frammenti di adenocarcinoma mucinoso in lembi superficiali di mucosa gastrica

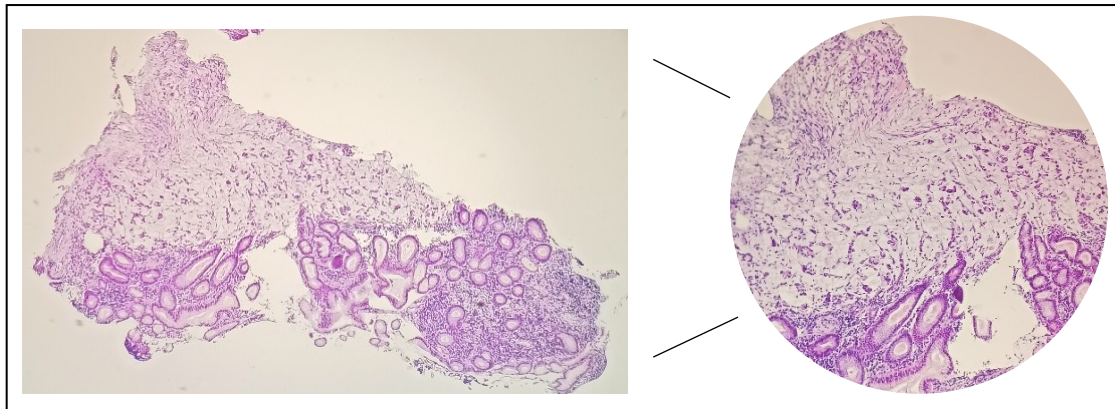


Figura 18 - Sezione di mucosa gastrica con adenocarcinoma mucinoso (Ematossilina-Eosina). A sinistra, a basso ingrandimento (5x), si osservano lembi superficiali di mucosa gastrica infiltrati da una proliferazione neoplastica ghiandolare. Nel dettaglio, a destra, a ingrandimento maggiore (10x), il preparato si caratterizza per la presenza di ampie lacune o "pozzanghere" di mucina extracellulare che disgregano lo stroma, all'interno delle quali sono sospesi nidi e cellule neoplastiche isolate. Nella parte inferiore dell'immagine sono visibili alcune ghiandole residue della mucosa gastrica nativa, parzialmente distorte dalla proliferazione tumorale circostante

CASO 14

Protocollo n° 4949/24

Descrizione macroscopica

5 frammenti giallastri

Indagine immunoistochimica

- HER2-neu: score 0
- CK8/18+, CK20-

Giudizio diagnostico

Mucosa gastrica sede di aree riferibili ad adenocarcinoma ad anello con castone

CASO 15

Protocollo n° 6297/24

Descrizione macroscopica

Corpo gastrico: 4 frammenti giallastri

Indagine immunoistochimica

- Nessuna

Giudizio diagnostico

Frammenti di adenocarcinoma con aspetti papillari, ulcerato

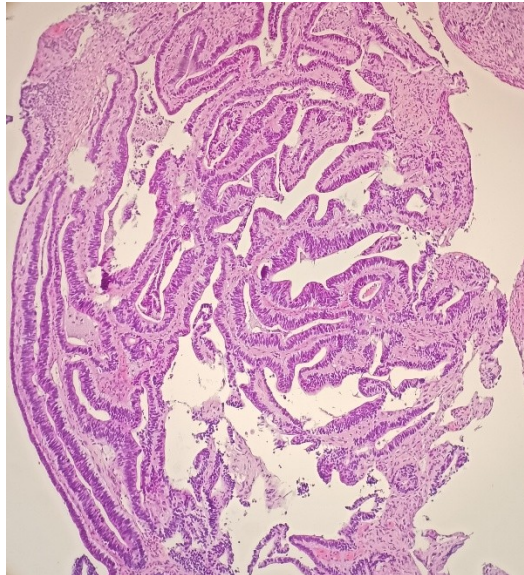


Figura 19 - Sezione biotica del corpo gastrico (Ematossilina-Eosina). Si osserva un frammento di adenocarcinoma gastrico caratterizzato da un'architettura papillare, con strutture digitiformi irregolari rivestite da epitelio neoplastico. È inoltre evidente un'ampia area di ulcerazione superficiale

CASO 16

Protocollo n° 6535/24

Descrizione macroscopica

- a) Antro: 2 frammenti giallastri
- b) Fondo: 2 frammenti giallastri
- c) Cardias: 4 frammenti giallastri

Indagine immunoistochimica

- HER2-neu: score 2+
- CK7, CK20, CK8/18

Giudizio diagnostico

- a) Mucosa gastrica di tipo antrale sede di gastrite cronica attiva ad impronta follicolare linfoide associata a infezione da *H. pylori*
- b) Un frammento di mucosa gastrica di tipo corpale con flogosi cronica ed un frammento di mucosa corpale con area riferibile ad adenocarcinoma (CK8/18+, CK20+)
- c) Frammenti ulcerati di mucosa esofago-cardiale sede di adenocarcinoma gastrico di tipo intestinale (CK7-, CK20+)

[si veda Figura 30 e Figura 31 in Appendice]

CASO 17

Protocollo n° 350/25

Descrizione macroscopica

Alcuni frammenti grigiastri

Indagine immunoistochimica

- HER2-neu: score 3+
- Sinaptofina-, CK7-, CDX2+

Giudizio diagnostico

Frammenti ulcerati di adenocarcinoma gastrico di tipo intestinale

CASO 18

Protocollo n° 3068/25

Descrizione macroscopica

- a) Antro e angulus: 3 frammenti
- b) Corpo: minuti frammenti

Indagine immunoistochimica

- HER2-neu: score 0

Giudizio diagnostico

- a) Frammenti di mucosa antrale e corpo-fundica con gastrite cronica lieve, inattiva, senza atrofia. Negativa la ricerca di *H. pylori*
- b) Frammenti di mucosa corpo-fundica occupati da localizzazione di adenocarcinoma gastrico ad istotipo scarsamente coeso, con componente a cellule ad anello con castone

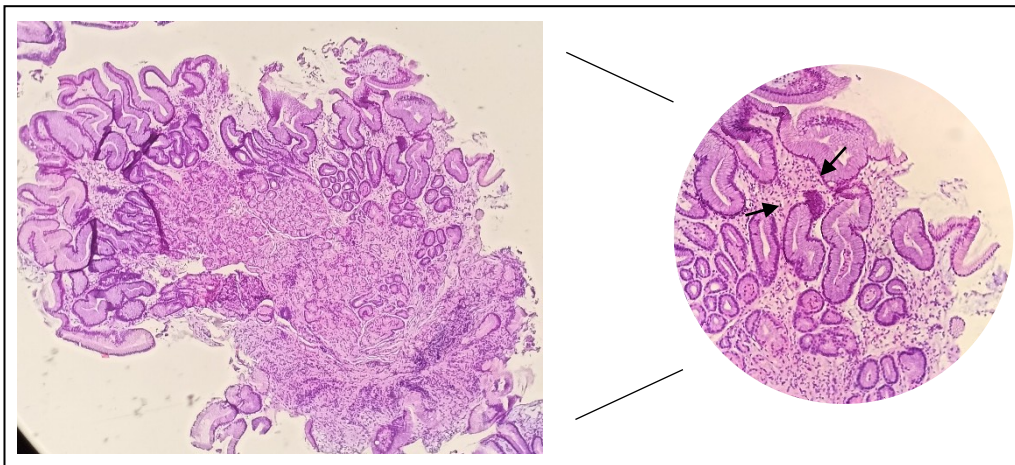


Figura 20 - Sezione di mucosa del corpo gastrico (Ematossilina-Eosina). A sinistra, a basso ingrandimento (5x), si osservano frammenti di mucosa corpo-fundica con marcata alterazione dell'architettura ghiandolare, dovuta alla presenza di una proliferazione neoplastica infiltrante che occupa lo stroma della mucosa (lamina propria), tra le ghiandole gastriche residue. La neoplasia è costituita da cellule scarsamente coese, isolate o organizzate in piccoli gruppi. A destra, a maggiore ingrandimento (20x), sono evidenziabili numerose cellule ad **anello con castone**, caratterizzate da vacuoli intracitoplasmatici con dislocazione periferica del nucleo

Dall'analisi dell'espressione della proteina HER2 si può vedere che dei 18 casi sopra riportati 10 sono stati valutati per determinare la sua espressione con metodica di immunohistochimica e in particolare i casi sono stati classificati nel seguente modo:

Casi		Espressione HER2
43/23	Adenocarcinoma ad anello con castone	Score 0
763/23	Adenocarcinoma scarsamente differenziato ad anello con castone	Score 0
224/24	Adenocarcinoma ad anello con castone	Score 2+
1108/24	Adenocarcinoma di tipo intestinale	Score 0
1153/24	Adenocarcinoma di tipo intestinale con aspetti mucinosi	Score 2+
4235/24	Adenocarcinoma mucinoso	Score 2+
4949/24	Adenocarcinoma ad anello con castone	Score 0
6535/24	Adenocarcinoma di tipo intestinale	Score 2+
350/25	Adenocarcinoma di tipo intestinale	Score 3+
3068/25	Adenocarcinoma scarsamente coeso con cellule ad anello con castone	Score 0

Tabella 2 - Risultati del profilo di espressione della proteina HER-2 valutata con tecnica immunohistochimica

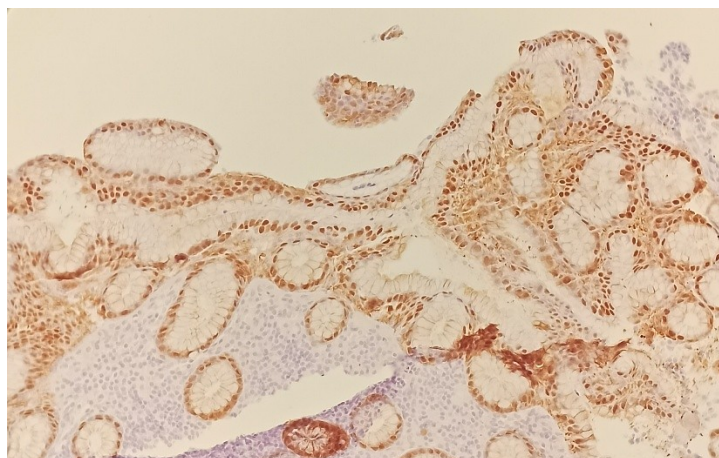
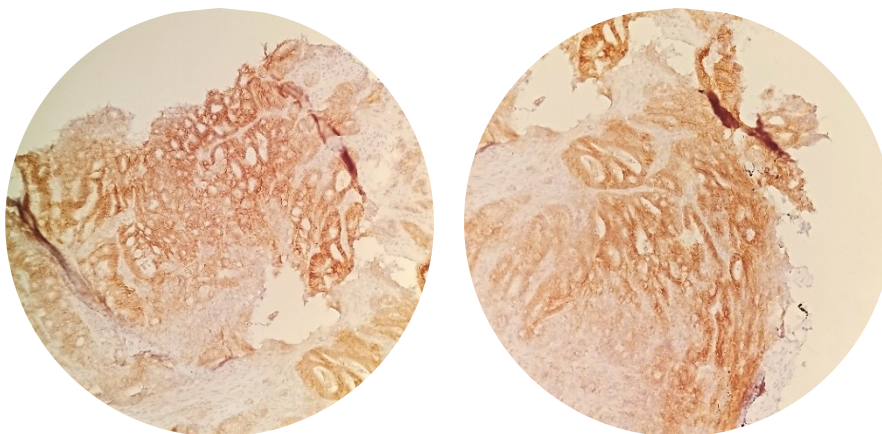


Figura 21 - Analisi immunohistochimica dell'espressione di HER-2 (Campione n° 224/24). In questa sezione di adenocarcinoma gastrico (score 2+) si osserva una reattività di membrana di intensità moderata, con il caratteristico pattern di colorazione basolaterale o laterale. È evidente l'eterogeneità intratumorale, caratterizzata da una distribuzione discontinua del segnale tra le cellule neoplastiche



*Figura 22 - **Analisi immunoistochimica dell'espressione di HER-2 (Campione n° 350/25).** In questa sezione di adenocarcinoma gastrico di tipo intestinale (**score 3+**) si osserva una forte e intensa reattività di membrana, caratterizzata da un pattern di colorazione basolaterale o laterale continuo. La marcatura, eseguita con anticorpo Ventana 4B5, appare marcata e diffusa nella popolazione cellulare neoplastica, indicando una netta iperespressione del recettore sulla superficie delle cellule tumorali*

5. Discussione

L'adenocarcinoma gastrico è una patologia multifattoriale riconducibile a diversi fattori di rischio, tra cui l'infezione da *Helicobacter pylori*, la presenza di gastrite, l'obesità, la tipologia di alimentazione piuttosto che l'età o il sesso. In particolare, spesso è possibile correlare la presenza di questa patologia tumorale con situazioni di infiammazione e di gastrite cronica, attiva o quiescente senza atrofia o con atrofia e metaplasia. La gastrite cronica attiva e l'eventuale metaplasia sono considerate proprio come lesioni precancerose, per cui è sempre opportuno segnalarne la presenza. Allo stesso modo l'ambiente infiammatorio che si crea è uno dei fattori che può contribuire allo sviluppo della patologia tumorale.

Riportando un esempio pratico nel caso numero 6535/24 insieme alla diagnosi di adenocarcinoma gastrico di tipo intestinale è stata anche segnalata la presenza a livello della mucosa antrale di una gastrite cronica attiva associata ad infezione da *H. pylori*, un altro fattore di rischio per la patologia tumorale.

Nell'ambito dell'adenocarcinoma gastrico assumono, inoltre, una certa rilevanza i marcatori molecolari che risultano essere fondamentali per la valutazione prognostica e predittiva dell'efficacia di una terapia bersaglio.

Il biomarcatore che viene comunemente utilizzato nella pratica di laboratorio come "test reflex" è rappresentato da HER-2, in quanto la sovraespressione della proteina HER-2 o l'amplificazione del gene ERBB2 sono implicate nello sviluppo dell'adenocarcinoma gastrico [8]. La positività per HER-2 è più comunemente osservata nei tumori di tipo intestinale rispetto ai tumori di tipo diffuso o misto, nei tumori che presentano un'instabilità cromosomica e nei tumori che originano dalla giunzione gastroesofagea rispetto a quelli che originano nel corpo dello stomaco. Circa il 15-20% degli adenocarcinomi in stadio avanzato situati a livello della giunzione gastroesofagea presentano una sovraespressione o un'amplificazione di HER-2 [22]. L'importanza della valutazione di questo biomarcatore si riflette sulla possibilità per i pazienti con tale tumore di avere accesso all'uso di terapie a bersaglio molecolare quali trastuzumab.

Trastuzumab è il primo anticorpo monoclonale utilizzato nella pratica clinica diretto contro HER-2. Agisce inducendo una citotossicità cellulare anticorpo-dipendente, inibendo la via di segnalazione mediata da HER-2 e prevenendo la scissione del dominio extracellulare della proteina così da impedire la promozione della crescita tumorale. Lo studio ToGA è stato il primo studio prospettico randomizzato di fase III che ha valutato l'efficacia e la sicurezza del trattamento con questo anticorpo monoclonale nei pazienti con adenocarcinoma gastrico in stadio avanzato che mostrano over espressione della proteina HER-2. In particolare, grazie a questo studio è stato

stabilito che l'aggiunta di trastuzumab alla chemioterapia con due agenti citotossici la fluoropirimidina o la capecitabina più il cisplatino può rappresentare un'opzione terapeutica per pazienti con tumori Her-2 positivi (score 3+ e 2+) con un miglioramento dei dati di sopravvivenza [8], [27].

Nell'ultimo decennio, il blocco dei checkpoint immunitari è emerso come un'ulteriore entusiasmante strategia di trattamento per vari tumori maligni, incluso l'adenocarcinoma gastrico. Questi checkpoint sono proteine di membrana il cui ruolo fisiologico è quello di regolare la risposta immunitaria. Le cellule tumorali sono in grado di eludere la sorveglianza immunitaria attraverso il reclutamento delle cellule immunosoppressive o esprimendo degli antigeni inibitori. L'obiettivo delle terapie volte a inibire tali meccanismi è proprio quello di preparare le cellule T citotossiche CD8+ a riconoscere e distruggere gli antigeni presenti sulle cellule tumorali.

PD-L1, in particolare, rappresenta uno di questi checkpoint immunitari e può essere considerato, dopo HER-2, come il secondo biomarcatore predittivo per l'adenocarcinoma gastrico. La sua espressione è più elevata nei tumori di tipo intestinale, in quelli che mostrano un'instabilità dei microsatelliti e in quelli positivi al virus di Epstein-Barr [28]. Le cellule tumorali che esprimono PD-L1 sfruttano infatti il legame PD-1/PD-L1 per facilitare l'evasione immunitaria, la crescita e la sopravvivenza del tumore, rendendo questa via un possibile bersaglio terapeutico tramite l'impiego di inibitori del checkpoint, tra cui pembrolizumab o nivolumab [22]. L'esecuzione del test immunoistochimico per verificare l'espressione di PD-L1 può essere presa in considerazione per i tumori gastrici localmente avanzati, ricorrenti o metastatici nei pazienti candidati al trattamento con il corrispondente inibitore. Per quanto riguarda invece il significato prognostico della positività di PD-L1 nel carcinoma gastrico rimane poco chiaro a causa di diversi fattori come la variabilità del test usato per rilevare PD-L1 o la piccola dimensione del campione che viene analizzato [8].

Pembrolizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato che legandosi ai recettori PD-1 presenti sulle cellule T ne inibisce l'attività impedendo così il legame del suo ligando PD-L1. Il blocco di questa via induce di conseguenza una risposta antitumorale [22]. Lo studio di fase III KEYNOTE-811 ha confrontato l'uso di pembrolizumab con il placebo in combinazione con trastuzumab e la chemioterapia con fluorouracile e cisplatino o capecitabina e oxaliplatino. Sulla base dei risultati di questo studio è stato successivamente approvato il suo utilizzo per i pazienti il cui tumore si presenta in stadio avanzato con un valore CPS > 1 e una positività ad HER-2 [8]. L'immunoterapia è stata quindi aggiunta con successo anche al trattamento di tumori caratterizzati da un'overespressione della proteina HER-2 [22].

Nivolumab è un altro anticorpo monoclonale PD-1 ed è un'altra tipologia di farmaco immunoterapico che agisce bloccando il recettore PD-1 stimolando il sistema immunitario a

riconoscere e distruggere le cellule tumorali. Il suo impiego è stato approvato sulla base dei risultati dello studio di fase III Checkmate-649 in combinazione con fluoropirimidina e chemioterapia a base di platino per il trattamento di prima linea dei pazienti con carcinoma gastrico avanzato o metastatico, HER-2 negativi, che esprimono PD-L1 con un CPS > 5 [8], [29].

Nella scelta del percorso terapeutico migliore per il paziente assume inoltre una certa rilevanza l'identificazione dei tumori con un deficit nel sistema del mismatch repair (dMMR) in quanto sono associati a una prognosi migliore nell'adenocarcinoma gastrico. Per il ruolo che ricoprono, il deficit di espressione di queste proteine rappresenta un biomarcatore predittivo fondamentale. Poiché i tumori con un'instabilità dei microsatelliti (MSI) e un dMMR mostrano un miglioramento significativo dal trattamento con l'immunoterapia rispetto alla chemioterapia tradizionale, lo screening di tali biomarcatori è strettamente raccomandato per tutti i pazienti con patologia localmente avanzata non resecabile o metastatica [29]. La scoperta di MSI-H/dMMR ha portato all'approvazione da parte della FDA di pembrolizumab (anti-PD-1) come farmaco terapeutico per i tumori che mostrano queste caratteristiche [23].

L'insieme dei biomarcatori utilizzati per il trattamento dei tumori in stadio avanzato e metastatico, localizzati principalmente a livello della giunzione gastrica e gastroesofagea, è stato recentemente ampliato con l'introduzione della valutazione immunoistochimica della Claudina18.2 (CLDN18.2) e la possibilità di trattamento con l'anticorpo monoclonale diretto contro questa molecola [30]. CLDN18.2 è un'isoforma della proteina claudina-18 e un membro di una classe di proteine denominate claudine. Queste proteine sono le componenti principali delle giunzioni strette che mediano fisiologicamente l'adesione cellula-cellula e regolano la permeabilità selettiva negli strati di cellule epiteliali [31]. CLDN18.2 è espressa esclusivamente nelle cellule della mucosa gastrica sia normali che neoplastiche [32]. Durante la trasformazione tumorale, viene persa la polarità cellulare e la proteina espone i suoi epitopi che normalmente sono inaccessibili agli anticorpi endovenosi, ciò li rende disponibili per il legame con un anticorpo monoclonale bersaglio [31], [32]. Pertanto, CLDN18.2 è considerata come un promettente bersaglio terapeutico emergente.

Zolbetuximab è un anticorpo monoclonale chimerico immunoglobulina G1 (IgG1) caratterizzato da un'elevata specificità e affinità per CLDN18.2. Il legame anticorpo-proteina media la morte cellulare delle cellule tumorali positive per claudina attraverso una citotossicità cellulare anticorpo-dipendente e una citotossicità complemento-dipendente [30], [32]. L'uso di questo anticorpo monoclonale chimerico IgG1 è stato testato in diversi studi clinici di fase I, II e III confermando il suo possibile impiego nel trattamento degli adenocarcinomi gastrici. In particolare, negli studi di fase I la monoterapia con zolbetuximab ha dimostrato un profilo di

sicurezza gestibile, tollerabilità e segni di attività anche in pazienti sottoposti a pretrattamento intensivo. Per questi pazienti, la positività a CLDN18.2 è stata definita come la presenza di colorazione tumorale di membrana, indipendentemente dall'intensità. Pertanto, i trial clinici di fase II hanno ulteriormente dimostrato che l'uso di questo anticorpo monoclonale in monoterapia o in combinazione con la chemioterapia è ben tollerato e ha un'attività antitumorale nei tumori in cui l'espressione di CLDN18.2 era stata fissata a diversi valori limite >50%, >70 e >75%. Infine, recentemente, sono stati pubblicati due studi randomizzati di fase III, Spotlight e Glow, che hanno mostrato risultati migliori nel trattamento dei tumori CLDN18.2 positivi, Her-2 negativi, per i pazienti sottoposti a terapia con zolbetuximab in combinazione con l'impiego di chemioterapici. In questo caso la positività a CLDN18.2 era stata fissata a più del 75% delle cellule tumorali. Sulla base di questi risultati, l'uso di zolbetuximab è stato quindi proposto come nuovo standard di cura nei pazienti con adenocarcinomi della giunzione gastrica e gastroesofagea CLDN18.2-positivi, Her-2 negativi, localmente avanzati e metastatici. Ulteriori studi stanno attualmente studiando possibili sinergie tra il targeting di CLDN18.2 e l'immunoterapia [30].

L'espressione di CLDN18.2 viene valutata mediante tecnica immunoistochimica. La prevalenza della positività a CLDN18.2 varia però tra gli studi pubblicati in letteratura a causa dell'uso di diversi cloni dell'anticorpo primario, di diversi cut off per la positività, di metodi di interpretazione della colorazione, di istologia/posizione del tumore e di tipo di campione (biopsia o resezione chirurgica) utilizzato per la valutazione immunoistochimica. Una cellula è considerata positiva quando è presente una colorazione di membrana nitida (completa, basolaterale o laterale) e in base all'intensità della colorazione. Quest'ultima può essere valutata con un punteggio compreso tra 0 e 3+: 0 assente; 1+ debole; 2+ moderata e 3+ forte [30]. Pertanto, i tumori sono considerati CLDN18.2 positivi se più del 75% delle cellule tumorali vitali mostrano una colorazione di membrana CLDN18.2 da moderata a forte (intensità 2+ o 3+) in immunoistochimica [8].

Un ulteriore biomarcatore emergente d'interesse come bersaglio terapeutico è il recettore 2 del fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR2). Si tratta di un recettore tirosin-chinasi la cui via di segnalazione intracellulare, dopo il legame con il suo ligando FGF, svolge un ruolo importante nel controllo della crescita, della proliferazione, della differenziazione, dell'angiogenesi e della sopravvivenza cellulare. Pertanto, la disregolazione del signaling FGF/FGFR contribuisce attivamente alla progressione tumorale promuovendo processi di proliferazione, invasione e migrazione cellulare [33].

Sono riportate diverse isoforme per FGFR2 di cui le due principali sono FGFR2b, che è anche l'isoforma più frequentemente sovraespressa nel carcinoma gastrico, e FGFR2c [34]. In genere si

ha l'iperattivazione di questa via di segnalazione FGF/FGFR che può essere causata da diverse alterazioni genomiche, tra cui amplificazione genica, mutazione attivante, traslocazione/fusione cromosomica e sovraespressione della proteina recettoriale.

L'impiego di terapie a bersaglio molecolare rivolte contro la proteina FGFR2 rappresenta un'opportunità per interrompere la proliferazione delle cellule tumorali proprio per il ruolo che essa ricopre nella progressione tumorale. In particolare, sono in corso degli studi per valutare la capacità predittiva della sovraespressione della proteina FGFR2b, rilevata mediante tecnica di immunoistochimica (IHC), per la terapia mirata con l'anticorpo monoclonale umanizzato bemarituzumab. Quest'ultimo è un anticorpo monoclonale IgG1, afucosilato, umanizzato di prima classe progettato per colpire selettivamente le cellule che sovraesprimono FGFR2b. Il suo meccanismo d'azione è duplice: da un lato inibisce competitivamente il legame del ligando FGF interrompendo il pathway di proliferazione cellulare e dall'altro potenzia la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente contro le cellule tumorali rendendo più efficace l'attacco da parte del sistema immunitario [33].

L'efficacia di questo approccio è stata indagata nello studio di fase 2 FIGHT, il quale valuta l'impiego di bemarituzumab in combinazione con il regime chemioterapico mFOLFOX6 (5-fluorouracile, leucovorina e oxaliplatino) per il trattamento dell'adenocarcinoma gastrico o della giunzione gastroesofagea in stadio avanzato con una sovraespressione del FGFR2b [35]. La selezione dei pazienti che hanno preso parte a questo studio si è basata sulla dimostrazione della sovraespressione di membrana di FGFR2b con metodica di immunoistochimica in almeno il 5% delle cellule tumorali [28]. Attualmente questa strategia terapeutica che prevede l'impegno di bemarituzumab più mFOLFOX6 è oggetto di ulteriore approfondimento nello studio di fase 3 FORTITUDE-101 e nel trial di fase 3 FORTITUDE-102 dove si valuta l'efficacia di questo anticorpo monoclonale in combinazione non più solo con mFOLFOX6 ma anche con nivolumab [35]. Per entrambi questi studi sono stati selezionati i pazienti che presentavano una colorazione di membrana per FGFR2b da moderata a forte in almeno il 10% delle cellule tumorali [34].

L'analisi dei biomarcatori emergenti CLDN18.2 e FGFR2b, unitamente a quelli già consolidati nella pratica clinica HER-2, PD-L1 e lo stato di MMR, delinea un approccio diagnostico sempre più complesso e stratificato volto a migliorare significativamente la sopravvivenza globale dei pazienti.

Biomarcatore	Studio di riferimento	Terapia bersaglio	Target/cut off
HER-2	ToGA	Trastuzumab	IHC 3+ o 2+
PD-L1	Checkmate-649 / KEYNOTE-811	Nivolumab / Pembrolizumab	CPS ≥ 5 o CPS ≥ 1
CLDN18.2	SPOTLIGHT / GLOW	Zolbetuximab	$\geq 75\%$ intensità 2+/3+
FGFR2b	FIGHT / FORTITUDE101 e FORTITUDE 102	Bemarituzumab	IHC $\geq 5\%$ (FIGHT) / IHC $\geq 10\%$ (FORTITUDE)

Tabella 3 - Riassunto dei principali biomarcatori relativi all'adenocarcinoma gastrico in associazione agli studi di riferimento per la terapia a bersaglio molecolare e il target verso cui è rivolta

6. Conclusione

In conclusione, il presente elaborato di tesi ha focalizzato la complessa gestione terapeutica e prognostica dell'adenocarcinoma gastrico, mettendo in evidenza il ruolo centrale dell'anatomia patologica contemporanea. Il cancro gastrico rimane una patologia grave e frequente, la cui gestione diagnostico-terapeutica è cambiata radicalmente negli ultimi anni con l'obiettivo di offrire ai pazienti opzioni terapeutiche sempre più efficaci e mirate.

L'analisi della casistica esaminata ha confermato come l'insorgenza della neoplasia sia spesso preceduta e accompagnata da un microambiente infiammatorio cronico. La frequente associazione riscontrata tra adenocarcinoma e quadri di gastrite cronica e attiva, atrofia ghiandolare e metaplasia intestinale sottolinea l'importanza del riconoscimento precoce di tali lesioni precancerose. In questo contesto patologico, l'identificazione di fattori di rischio come l'infezione da *H. pylori* rimane un passaggio cruciale non solo per la prevenzione, ma anche per la comprensione della patogenesi stessa del tumore.

Nell'iter diagnostico il primo approccio si basa sull'osservazione della morfologia del campione ad opera dell'anatomo patologo che ha il compito di definire l'istotipo tumorale secondo la classificazione di Lauren e dell'OMS. Tuttavia, oggi l'analisi morfologica nell'ambito dell'adenocarcinoma gastrico deve essere affiancata dalla definizione del profilo molecolare. Il numero di biomarcatori clinicamente rilevanti nel tumore gastrico, infatti, è in continua crescita, proprio perché un profilo completo di questi biomarker può fornire informazioni preziose per valutare le opzioni di trattamento per ciascun paziente.

HER2 è uno dei primi biomarcatori predittivi, testato negli adenocarcinomi gastrici, ad essere stato introdotto nella pratica di routine. Successivamente, l'introduzione degli inibitori dei checkpoint immunitari nella pratica clinica ha reso indispensabile la valutazione immunoistochimica dell'espressione di PD-L1 e l'indagine dello stato delle proteine del Mismatch Repair (MMR), fondamentale per individuare i difetti nel sistema di riparazione del DNA. Infine, è in fase di valutazione il valore predittivo di altri marcatori molecolari emergenti come CLDN18.2 e FGFR2b. Infatti, per quanto riguarda l'espressione di CLDN18.2, testata mediante immunoistochimica, questa entrerà presto nella pratica clinica quotidiana per la selezione di pazienti con adenocarcinomi della giunzione gastrica e gastroesofagea in stadio avanzato e metastatico che potrebbero trarre beneficio da approcci terapeutici anti-CLDN18.2. Allo stesso modo è in corso di indagine il ruolo di FGFR2b come bersaglio molecolare terapeutico per ridurre la proliferazione delle cellule tumorali.

L'identificazione di nuovi ulteriori biomarcatori ha il potenziale di rivoluzionare la stratificazione dei pazienti, permettendo di superare i limiti della chemioterapia tradizionale a favore di strategie basate sulla medicina di precisione. In definitiva, l'integrazione tra l'analisi morfologica tradizionale e le tecniche di immunistochemica avanzata rappresenta oggi lo standard imprescindibile per migliorare la prognosi e la qualità della vita dei pazienti affetti da questa neoplasia.

7. Appendice

In questa sezione sono riportate le immagini relative ai casi mancanti nella sezione risultati indicate per numero di protocollo.

Protocollo n° 763/23

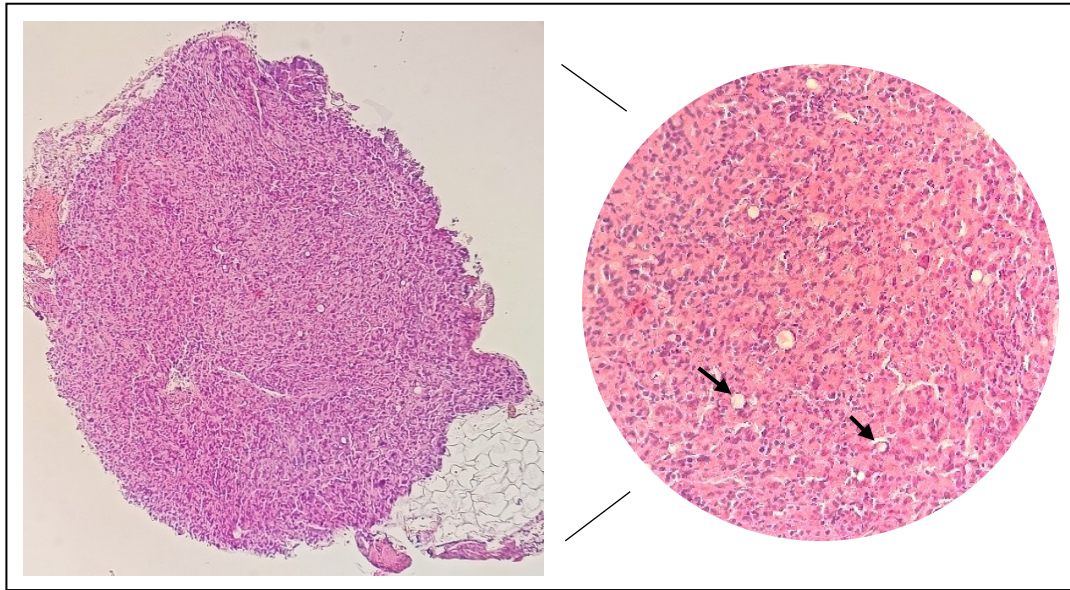


Figura 23 - Sezione di mucosa esofago-cardiale sede di adenocarcinoma scarsamente differenziato del tipo "ad anello con castone" (Ematossilina-Eosina). A sinistra, a basso ingrandimento (10x), si osserva la crescita dissociata delle cellule neoplastiche che infiltrano il tessuto in modo massivo, sostituendo le normali strutture ghiandolari. A destra, ad alto ingrandimento (40x), si osserva la tipica morfologia dell'adenocarcinoma ad anello con castone: le cellule neoplastiche appaiono isolate o in piccoli aggregati, caratterizzate da un citoplasma ampiamente vacuolizzato che sposta il nucleo verso la periferia cellulare. Le frecce indicano un esempio di cellule ad anello con castone

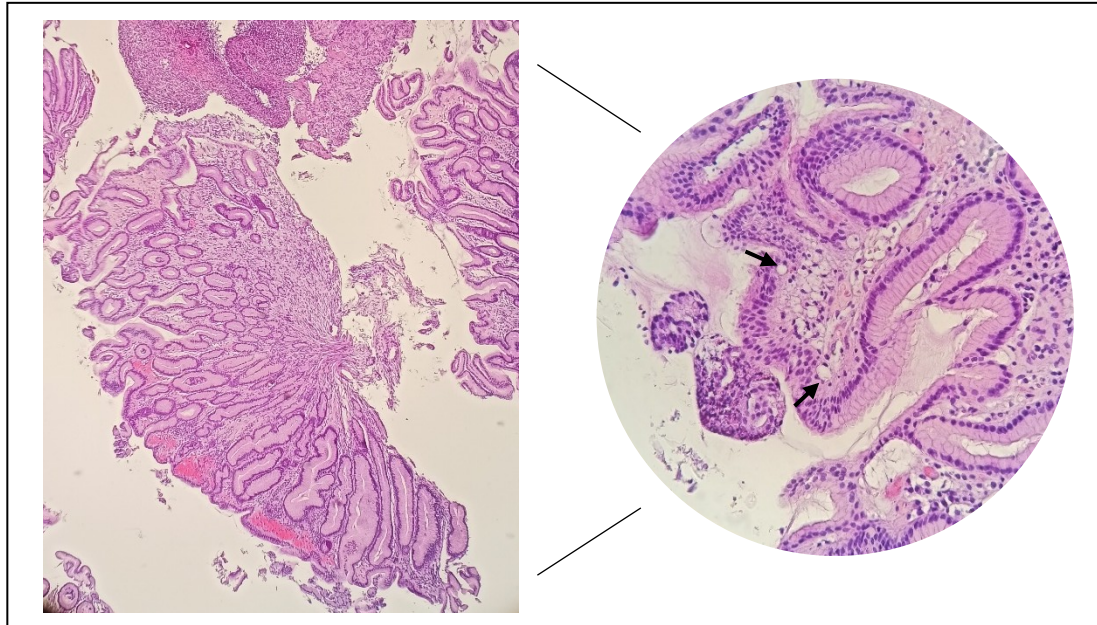


Figura 24 - Sezione di mucosa gastrica antrale sede di foci di adenocarcinoma con aspetto “ad anello con castone” (Ematossilina-Eosina). A sinistra, a basso ingrandimento (5x), si osserva l’architettura della mucosa antrale con ghiandole parzialmente conservate e stroma infiltrato da una popolazione cellulare atipica. In alto sono visibili frammenti di essudato fibrino-leucocitario. A destra, ad alto ingrandimento (40x), si apprezza il pattern di crescita dissociata: le cellule neoplastiche infiltrano lo stroma interghiandolare in modo isolato, presentando il tipico citoplasma vacuolizzato che comprime il nucleo verso la periferia (morfologia ad anello con castone).

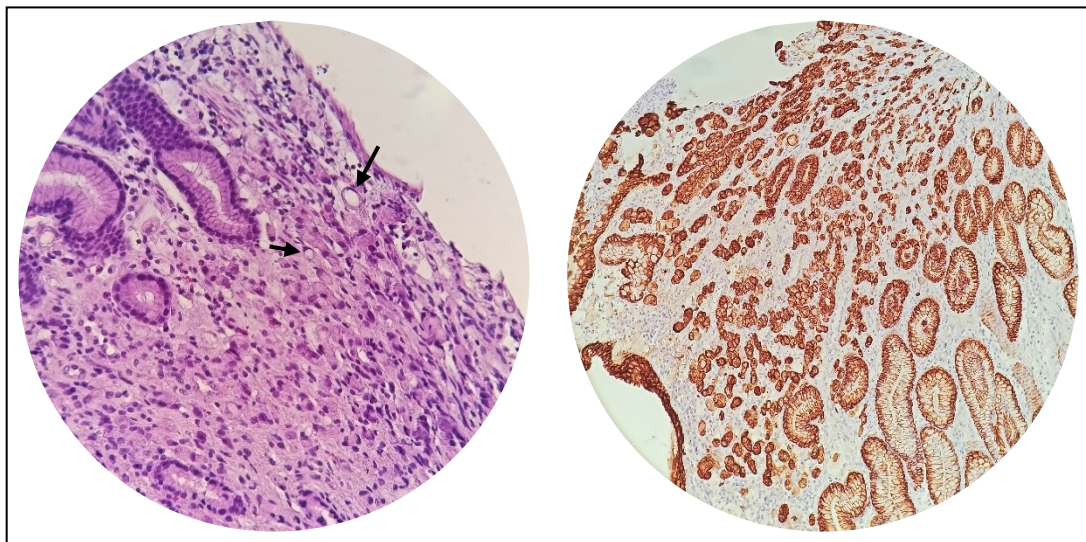


Figura 25 - Dettaglio citologico e validazione immunoistochimica delle cellule ad anello con castone. A sinistra, ad alto ingrandimento (40x, Ematossilina-Eosina), si osserva la tipica morfologia delle cellule neoplastiche: gli elementi appaiono isolati, con un ampio vacuolo citoplasmatico che comprime il nucleo verso la periferia cellulare. A destra (20x, CK8/18), la marcatura immunoistochimica per le citocheratine a basso peso molecolare conferma l’origine epiteliale di tali elementi, evidenziandone con precisione la crescita dissociata e l’infiltrazione all’interno dello stroma interghiandolare

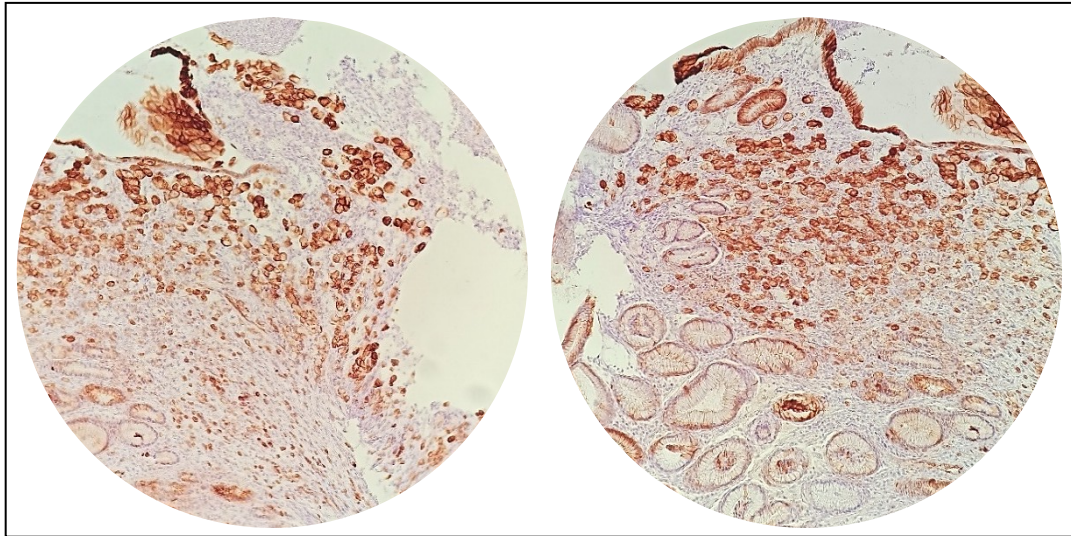


Figura 26 - Caratterizzazione immunoistochimica per la Citocheratina 7 (CK7). Le sezioni mostrano una marcata e diffusa positività citoplasmatica (colorazione marrone) per CK7 nelle cellule dell'adenocarcinoma. A sinistra (**20x**), la marcatura permette di distinguere nettamente le cellule ad anello con castone infiltranti lo stroma, che altrimenti risulterebbero difficilmente identificabili rispetto ai nidi di flogosi cronica. A destra (**20x**), si osserva la positività sia nelle cellule isolate che nelle strutture ghiandolari residue della mucosa antrale, confermando il fenotipo epiteliale della neoplasia

Protocollo n° 4977/23

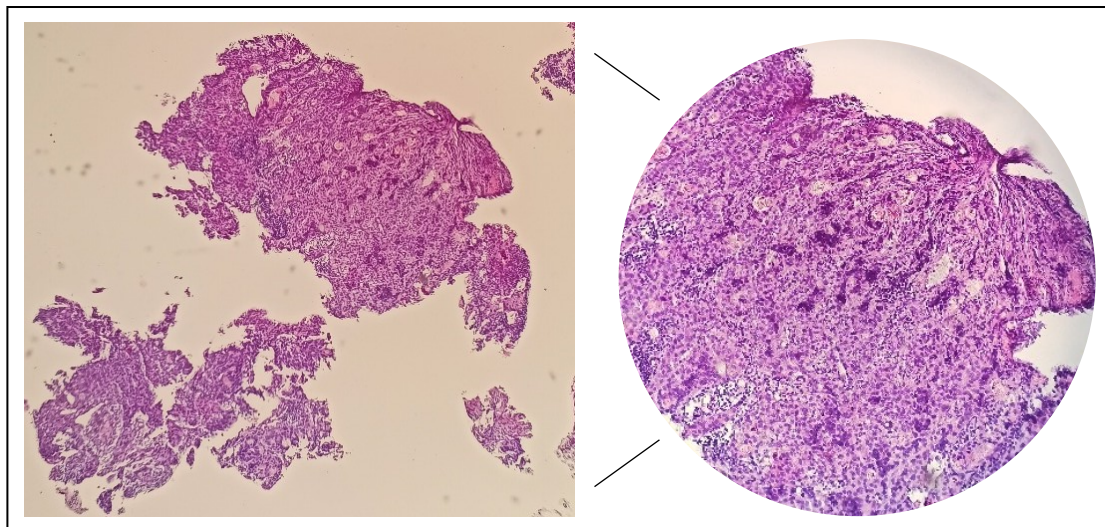


Figura 27 - Adenocarcinoma dell'antra gastrico scarsamente differenziato (Ematossilina-Eosina). A sinistra a basso ingrandimento (**10x**), si osserva un'estesa infiltrazione neoplastica che sovrverte l'architettura della mucosa. Il dettaglio a **20x** (a destra) evidenzia un pattern di crescita solido, caratterizzato da nidi di cellule atipiche privi di lume ghiandolare.

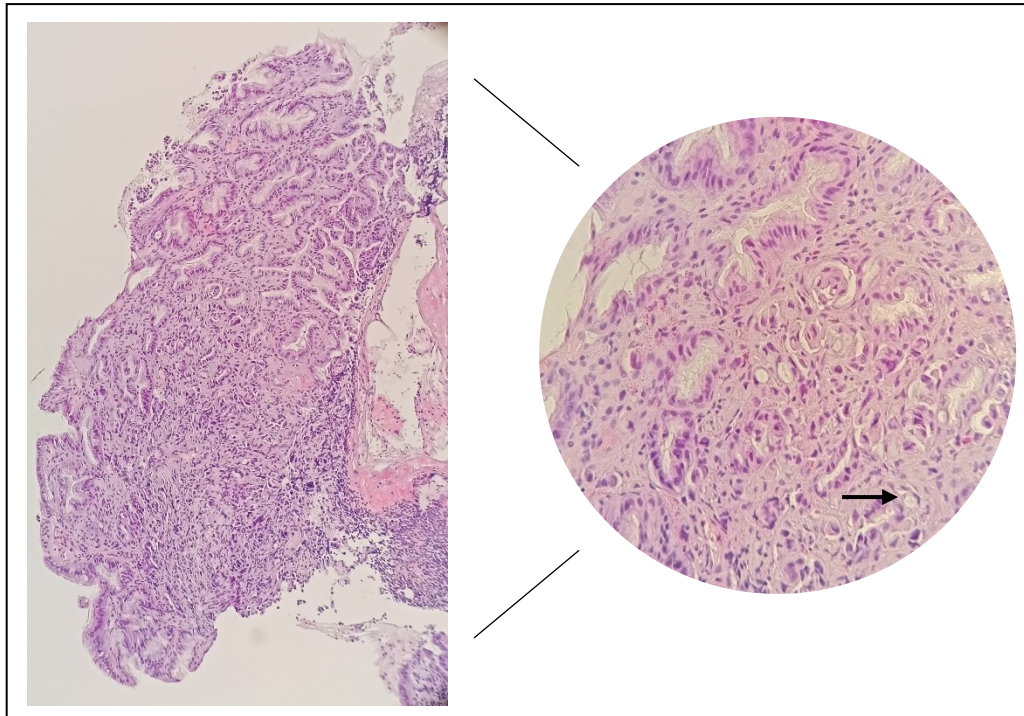


Figura 28 - Sezione di mucosa esofago cardiale sede di adenocarcinoma del tipo “ad anello con castone” (Ematossilina-Eosina). A sinistra, a basso ingrandimento (10x), si osserva un marcato sovvertimento dell'architettura tissutale dovuto alla proliferazione di strutture ghiandolari atipiche e irregolari. A destra, a maggiore ingrandimento (40x), si osservano cellule neoplastiche isolate con citoplasma otticamente chiaro (espanso da vacuoli di mucina) e nucleo eccentrico, identificabili come cellule ad anello con castone (freccia)

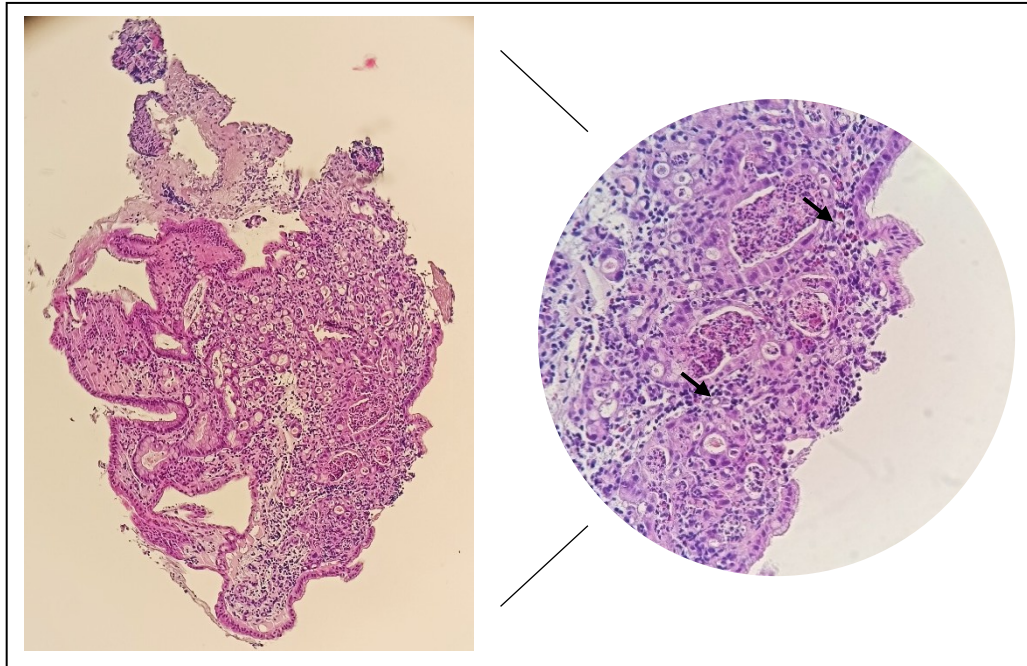


Figura 29 - Sezione di mucosa gastrica sede di adenocarcinoma del tipo “ad anello con castone” (Ematossilina-Eosina). A sinistra, a basso ingrandimento (**10x**) si osserva la crescita dissociata delle cellule neoplastiche che infiltrano il tessuto in modo massivo, sostituendo le normali strutture ghiandolari della mucosa fundica. A destra, ad alto ingrandimento (**40x**), si evidenzia la tipica morfologia dell’adenocarcinoma ad anello con castone: le cellule neoplastiche appaiono isolate o in piccoli aggregati immersi in uno stroma reattivo. Sono caratterizzate da un citoplasma ampiamente vacuolizzato per l’accumulo di muco, che sposta il nucleo verso la periferia cellulare

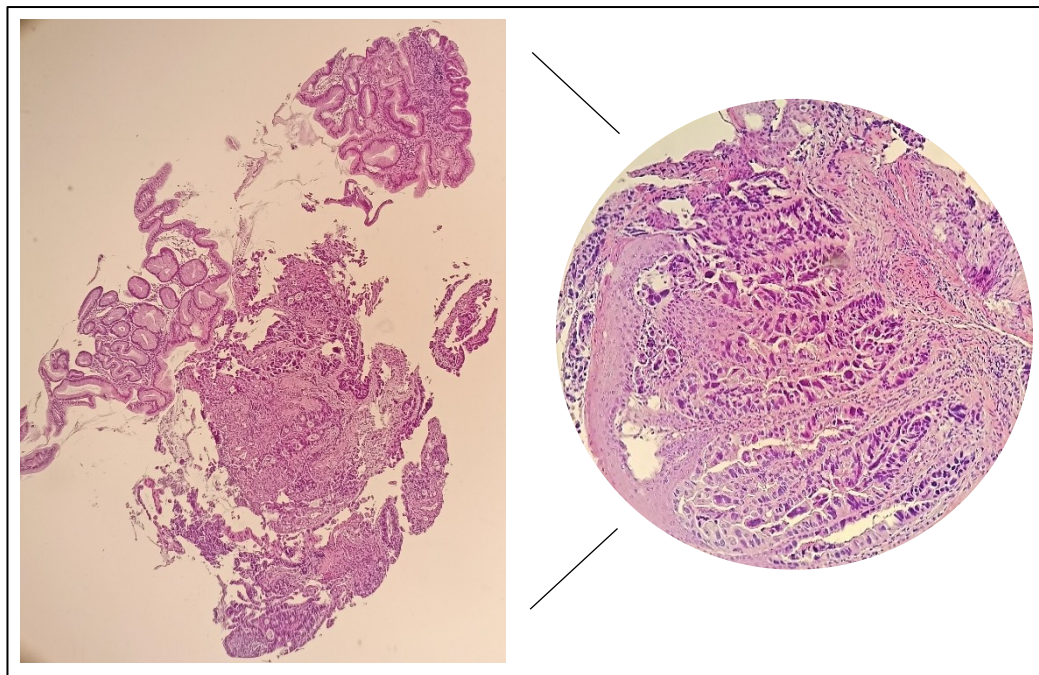


Figura 30 - Sezione di mucosa gastrica sede di adenocarcinoma di tipo intestinale (Ematossilina-Eosina). A sinistra, a basso ingrandimento (10x), si osserva una proliferazione di ghiandole irregolari, di dimensioni variabili, che infiltrano la lamina propria. Le ghiandole appaiono "schiena contro schiena" (back-to-back), con una riduzione dello stroma interposto, segno tipico della crescita neoplastica ghiandolare. A destra, ad alto ingrandimento (40x), si vogliono mettere in evidenza le struttura ghiandolari atipiche rivestite da epitelio cilindrico pluristratificato

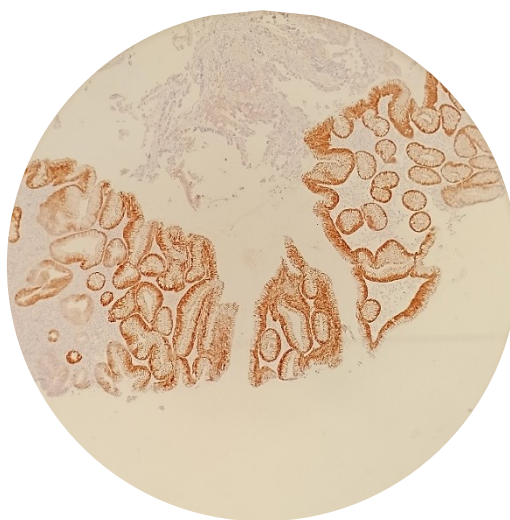


Figura 31 - Analisi immunoistochimica dell'espressione di HER-2. In questa sezione di adenocarcinoma gastrico di tipo intestinale (score 2+) si osserva una reattività di membrana di intensità moderata, con il caratteristico pattern di colorazione basolaterale o laterale

8. Bibliografia

- [1] J. W. H. P. W. Barbara Young, *Wheater. Istologia e anatomia microscopica*, Sesta edizione. 2014.
- [2] Barbatelli - Bertoni - Boccafoschi - Bosetti - Carini - AAVV, *Anatomia umana - Fondamenti - Con istituzioni di Istologia*. 2018.
- [3] Fondazione Humanitas Ricerca, «Enciclopedia anatomia dello stomaco fondazione humanitas ricerca», <https://fondazionehumanitasricerca.it/enciclopedia/anatomia/stomaco/>.
- [4] P. López Sala, M. Leturia Etxeberria, E. Inchausti Iguíñiz, A. Astiazaran Rodríguez, M. I. Aguirre Oteiza, e M. Zubizarreta Etxaniz, «Gastric adenocarcinoma: A review of the TNM classification system and ways of spreading», *Radiología (English Edition)*, vol. 65, n. 1, pagg. 66–80, gen. 2023, doi: 10.1016/j.rxeng.2022.10.011.
- [5] Fondazione AIRC per la Ricerca sul Cancro ETS, «Tumore dello stomaco».
- [6] M. I. Stancu *et al.*, «Assessment of tumor microenvironment in gastric adenocarcinoma», *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, vol. 64, n. 2, pagg. 251–261, 2023, doi: 10.47162/RJME.64.2.16.
- [7] F. Bray *et al.*, «Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries», *CA Cancer J. Clin.*, vol. 74, n. 3, pagg. 229–263, mag. 2024, doi: 10.3322/caac.21834.
- [8] J. A. Ajani *et al.*, «Gastric Cancer, Version 2.2025», *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, vol. 23, n. 5, pagg. 169–191, mag. 2025, doi: 10.6004/jnccn.2025.0022.
- [9] D. Forman e V. J. Burley, «Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors», *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, vol. 20, n. 4, pagg. 633–649, 2006, doi: 10.1016/j.bpg.2006.04.008.
- [10] H. S. Laird-Fick, S. Saini, e J. R. Hillard, «Gastric adenocarcinoma: The role of helicobacter pylori in pathogenesis and prevention efforts», 1 agosto 2016, *BMJ Publishing Group*. doi: 10.1136/postgradmedj-2016-133997.
- [11] C. B. Conti *et al.*, «Early Gastric Cancer: Update on Prevention, Diagnosis and Treatment», 1 febbraio 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/ijerph20032149.

- [12] O. Cavatorta *et al.*, «Epidemiology of gastric cancer and risk factors», 2018, *Mattioli 1885*. doi: 10.23750/abm.v89i8-S.7966.
- [13] I. Gullo *et al.*, «Precancerous lesions of the stomach, gastric cancer and hereditary gastric cancer syndromes», 1 settembre 2020, *Pacini Editore S.p.A./AU-CNS*. doi: 10.32074/1591-951X-166.
- [14] Gruppo di lavoro Linea Guida Associazione Italiana di Oncologia Medica 2020 “NEOPLASIE DELLO STOMACO e della GIUNZIONE ESOFAGO-GASTRICA”, «INFORMAZIONI PER I PAZIENTI CARCINOMA DELLO STOMACO».
- [15] Z. Song, Y. Wu, J. Yang, D. Yang, e X. Fang, «Progress in the treatment of advanced gastric cancer», 1 luglio 2017, *SAGE Publications Ltd*. doi: 10.1177/1010428317714626.
- [16] F. Lordick *et al.*, «Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up», *Annals of Oncology*, vol. 33, n. 10, pagg. 1005–1020, ott. 2022, doi: 10.1016/j.annonc.2022.07.004.
- [17] Y. Ye *et al.*, «Metabolism-associated molecular classification of gastric adenocarcinoma», *Front. Oncol.*, vol. 12, nov. 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.1024985.
- [18] C. Röcken, «Predictive biomarkers in gastric cancer», 1 gennaio 2023, *Springer Science and Business Media Deutschland GmbH*. doi: 10.1007/s00432-022-04408-0.
- [19] J. Ma, H. Shen, L. Kapesa, e S. Zeng, «Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer (Review)», 1 maggio 2016, *Spandidos Publications*. doi: 10.3892/ol.2016.4337.
- [20] R. Kushima, «The updated WHO classification of digestive system tumours—gastric adenocarcinoma and dysplasia», 1 febbraio 2022, *Springer Medizin*. doi: 10.1007/s00292-021-01023-7.
- [21] O. I. Crețu, A. E. Stepan, C. E. Simionescu, D. Marinescu, e M. D. Stepan, «Classification and Grading Systems in Gastric Adenocarcinomas.», *Curr. Health Sci. J.*, vol. 48, n. 3, pagg. 284–291, 2022, doi: 10.12865/CHSJ.48.03.06.
- [22] S. S. Joshi e B. D. Badgwell, «Current treatment and recent progress in gastric cancer», *CA Cancer J. Clin.*, vol. 71, n. 3, pagg. 264–279, mag. 2021, doi: 10.3322/caac.21657.
- [23] J. E. Rogers, M. Sewastjanow D Silva, R. E. Waters, e J. A. Ajani, «Pharmaceutical advances in the treatment of gastric adenocarcinoma», 2022, *Taylor and Francis Ltd*. doi: 10.1080/14656566.2022.2032644.

- [24] Y. Park *et al.*, «PD-L1 Testing in Gastric Cancer by the Combined Positive Score of the 22C3 PharmDx and SP263 Assay with Clinically Relevant Cut-offs», *Cancer Res. Treat.*, vol. 52, n. 3, pagg. 661–670, lug. 2020, doi: 10.4143/crt.2019.718.
- [25] A. Gambella *et al.*, «Critical insights on real-life PD-L1 histopathological workflow and assessment in esophageal, esophagogastric junction, and gastric carcinoma in Italy», *ESMO Open*, vol. 10, n. 10, ott. 2025, doi: 10.1016/j.esmoop.2025.105846.
- [26] V. Angerilli *et al.*, «A practical approach for PD-L1 evaluation in gastroesophageal cancer», 1 aprile 2023, *Pacini Editore S.p.A./AU-CNS*. doi: 10.32074/1591-951X-836.
- [27] S. Korea *et al.*, «Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial», *Lancet*, vol. 376, pagg. 687–97, 2010, doi: 10.1016/S0140.
- [28] J. Taieb, J. Bennouna, F. P. Llorca, D. Basile, E. Samalin, e A. Zaanan, «Treatment of gastric adenocarcinoma: A rapidly evolving landscape», 1 dicembre 2023, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.ejca.2023.113370.
- [29] «Allegato 5 : Trattamenti sistemici».
- [30] M. Fassan, T. Kuwata, K. A. Matkowskyj, C. Röcken, e J. Rüschoff, «Claudin-18.2 Immunohistochemical Evaluation in Gastric and Gastroesophageal Junction Adenocarcinomas to Direct Targeted Therapy: A Practical Approach», 1 novembre 2024, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.modpat.2024.100589.
- [31] A. Pellino *et al.*, «Association of cldn18 protein expression with clinicopathological features and prognosis in advanced gastric and gastroesophageal junction adenocarcinomas», *J. Pers. Med.*, vol. 11, n. 11, nov. 2021, doi: 10.3390/jpm11111095.
- [32] K. Shitara *et al.*, «Zolbetuximab plus mFOLFOX6 in patients with CLDN18.2-positive, HER2-negative, untreated, locally advanced unresectable or metastatic gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (SPOTLIGHT): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial», *The Lancet*, vol. 401, n. 10389, pagg. 1655–1668, mag. 2023, doi: 10.1016/S0140-6736(23)00620-7.
- [33] E. C. Smyth *et al.*, «FGFR2b protein overexpression: An emerging biomarker in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma», 1 settembre 2025, *W.B. Saunders Ltd.* doi: 10.1016/j.ctrv.2025.102971.

- [34] S. Y. Rha *et al.*, «Prevalence of FGFR2b Protein Overexpression in Advanced Gastric Cancers During Prescreening for the Phase III FORTITUDE-101 Trial», *JCO Precis. Oncol.*, n. 9, apr. 2025, doi: 10.1200/po-24-00710.
- [35] Z. A. Wainberg *et al.*, «Bemarituzumab in patients with FGFR2b-selected gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FIGHT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study», *Lancet Oncol.*, vol. 23, n. 11, pagg. 1430–1440, nov. 2022, doi: 10.1016/S1470-2045(22)00603-9.

9. Ringraziamenti

Ora che sono arrivata alla conclusione di questo percorso, ci tengo innanzitutto a ringraziare le persone che hanno reso possibile la realizzazione di questa tesi.

Un profondo ringraziamento va alla mia relatrice, la Dottoressa Stefania Erra. Grazie non solo per avermi dato l'opportunità di svolgere questo stimolante lavoro sperimentale presso il Servizio di Anatomia Patologica della Clinica Santa Rita di Vercelli, ma anche per avermi guidata con dedizione in ogni fase, per la sua costante disponibilità, i suoi consigli e la pazienza nel trasmettermi la passione per questa materia.

Un grazie sincero va a tutto il personale del Servizio di Anatomia Patologica, in particolare alle tecniche di laboratorio, per avermi mostrato, con estrema gentilezza e professionalità, l'intero percorso necessario per arrivare dal campione al vetrino.

Un ringraziamento speciale va, inoltre, a tutte le ragazze con cui ho condiviso una parte o la totalità del mio percorso di tirocinio. Grazie per il sostegno reciproco, l'aiuto nei momenti di dubbio e le tante risate scambiate, che hanno reso questa esperienza ancora più piacevole e indimenticabile.

Il traguardo più grande lo dedico però alla mia famiglia. Un grazie immenso va ai miei genitori, mamma e papà, per avermi supportata non solo moralmente, ma anche economicamente in tutto questo percorso. Grazie per avermi sostenuta e per avermi fornito i mezzi per frequentare l'università senza troppe preoccupazioni. Grazie per non aver mai dubitato delle mie capacità e, soprattutto, per aver dato sempre più peso ai miei successi e agli esami superati, anziché a quelli in cui non mi sono presentata o che ho dovuto ripetere (sì, anche a te papà, che dopo un primo momento di brontolio ti rassegnavi all'idea che l'avrei semplicemente dato la volta successiva). La vostra fiducia e la certezza di avervi sempre al mio fianco sono state fondamentali per arrivare fin qui.

Un enorme grazie va a mia sorella Laura, il mio esempio da sempre e per sempre: senza di te niente sarebbe stato lo stesso. Grazie perché, anche mentre costruivi la tua famiglia, hai sempre trovato del tempo da dedicare alla tua sorellina, per avermi ascoltata e aiutata ogni volta che te lo chiedevo, e per avermi dato negli anni un esempio di determinazione e forza da seguire per trovare il modo di arrivare dove si vuole. Non posso non ringraziarti anche per avermi resa zia: sono sicura che un giorno anche Romeo vedrà e capirà quanto è fantastica la sua mamma. Ti voglio un mondo di bene.

Un ringraziamento assolutamente speciale va alle mie "assistenti di studio" a quattro zampe, Kira e Olly, due border collie super attive ma incredibilmente pazienti: mi avete ascoltata ripetere per ogni singolo esame, rigorosamente dormendo e possibilmente da un'altra stanza per avere la vostra pace, ma sempre pronte a scattare sull'attenti perché l'unica pausa concessami prevedeva l'andare a giocare insieme. Grazie a Kira, un vero terremoto che ha calpestato infiniti fogli di appunti pur di avere una carezza, e a Olly, super delicata, che non nascondeva il suo fastidio nel vedermi studiare ancora dopo anni, sbuffando prima di mettersi a dormire. In questi 10 e 8 anni insieme, la vostra allegria ed esuberanza sono state la mia ricarica preferita nei momenti di stanchezza. Un grazie non può mancare anche a chi, occasionalmente, mi ha visto studiare e ha cercato di mangiarsi appunti e penne – sì, parlo della piccola Crema, che poi per fortuna è cresciuta – e un grazie va anche a Macchia e ai suoi tentativi di sabotarmi il computer.

Un grazie immenso va alla mia amica del cuore, Carmen. Grazie per essere stata la mia ancora di salvataggio in tutti questi anni, per aver ascoltato ogni mio sfogo e paranoia universitaria e per esserci sempre stata, a prescindere dalla distanza o dagli impegni. Grazie per la tua presenza, per aver creduto in me quando io stessa non ci riuscivo e per avermi spronata a fare di meglio. Non smetterò mai di essere grata per quell'unica cosa bella che il liceo ha scelto di lasciarmi: tra quei banchi è cresciuta la nostra amicizia, che continua forte ancora oggi. Condividere questo percorso con te ha reso tutto più leggero e sono immensamente felice di averti al mio fianco anche in questo momento così importante. Indipendentemente da cosa ti riserverà il futuro, so che troverai sempre il modo di percorrere la tua strada e prenderti il tuo posto nel mondo. Ti voglio un bene infinito.

Un pensiero speciale va a tutte le persone che, in modi diversi, hanno fatto parte di questo percorso e mi hanno sostenuto da vicino e da lontano. Grazie a mia zia Teresa, per avermi accompagnata con le sue preghiere e i suoi immancabili ceri accesi, e a mia zia Fiorella, per essersi sempre informata con affetto del mio cammino. Grazie a mio cognato Tino, che mi ha praticamente visto crescere e ora mi vedrà anche prendere questa laurea. Ma il grazie più profondo e colmo di emozione va alla mia nonna Pasqua, l'unica nonna che potrà essere presente a questo mio traguardo: averti al mio fianco in questo giorno rende tutto infinitamente più prezioso. E un pensiero infinitamente dolce va alla mia adorata nonna Anna: anche se sei mancata prima ancora che mi iscrivessi a questa laurea magistrale, so che mi hai seguita da ovunque tu sia, come hai sempre fatto. Conservi un posto speciale nel mio cuore e nella mia vita, e questa laurea è anche per te. Grazie di cuore a tutti voi per avermi teso la mano, ognuno a suo modo, e un ringraziamento speciale va anche a chi, pur non essendo stato nominato, c'è sempre stato e ha fatto il tifo per me.