



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare e Biotecnologie.  
Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica avanzata (BI.N.D.)  
Settore Scientifico Disciplinare MED/08 – Anatomia Patologica

## **I CARCINOMI TRIPLO-NEGATIVI DELLA MAMMELLA: caratterizzazione morfologica e immunoistochimica della stromatogenesi tumorale, del contesto immunologico e studio dell'espressione del recettore androgenico.**

IL DOTTORE

**Dott. ANTONINO GIULIO GIANNONE**

IL COORDINATORE

**Ch.mo Prof. MASSIMO MIDIRI**

IL TUTOR

**Ch.ma Prof.ssa ADA MARIA FLORENA**

CICLO XXXIII

ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2021

# INDICE

|   |     |
|---|-----|
| <b>1. INTRODUZIONE</b> .....  | 2   |
| <b>1.1. Classificazione molecolare dei carcinomi della mammella e correlazioni immunomorfologiche</b> ..... | 6   |
| <b>1.2. Stromatogenesi neoplastica</b> .....  | 14  |
| <b>1.3. Contesto immunologico tumorale</b> .....  | 23  |
| 1.3.1. Elementi cellulari del contesto immunologico tumorale.....   | 24  |
| <b>1.4. Immunoscore</b> .....   | 31  |
| <b>1.5. Valutazione dei linfociti infiltranti il tumore (TILs)</b> .....                                    | 34  |
| <b>1.6. Approcci immunoterapeutici nei carcinomi triplo-negativi della mammella</b> .....                   | 37  |
| 1.6.1. Check-point immunologici.....  | 38  |
| <b>1.7. Il recettore androgenico nei carcinomi triplo-negativi</b> .....                                    | 44  |
| <b>2. OBIETTIVO DELLA TESI</b> .....  | 46  |
| <b>3. MATERIALI E METODI</b> .....  | 47  |
| <b>3.1. Significato degli anticorpi impiegati e metodica di valutazione</b> .....                           | 49  |
| <b>3.2. Determinazione dell'immunoscore</b> .....   | 50  |
| <b>3.3. Acquisizione e analisi dei dati</b> .....   | 51  |
| <b>4. RISULTATI</b> .....   | 52  |
| <b>4.1. Pattern di stromatogenesi neoplastica</b> .....   | 56  |
| <b>4.2. Variabili morfologiche e immunoistochimiche</b> .....   | 57  |
| <b>4.3. Analisi statistica di correlazione</b> .....  | 82  |
| <b>4.4. Studio dell'espressione del recettore per androgeni nei carcinomi triplo-negativi</b> .....         | 84  |
| <b>5. DISCUSSIONE</b> .....   | 92  |
| <b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....  | 100 |

## 1. INTRODUZIONE

Il carcinoma della mammella è il tumore più frequentemente diagnosticato nelle donne in Italia, con 54976 nuove diagnosi stimate per il 2020 (il 30,3% di tutti i tumori femminili).

Tra i fattori di rischio: età, fattori riproduttivi, fattori ormonali, fattori dietetici e metabolici, pregressa radioterapia a livello toracico, precedenti displasie o neoplasie mammarie, familiarità ed ereditarietà.

Grazie allo screening e alla maggior consapevolezza delle donne, la maggior parte dei tumori maligni mammari è diagnosticata in fase iniziale quando il trattamento chirurgico può essere più spesso conservativo e la terapia adottata più efficace permettendo di ottenere sopravvivenze a 5 anni molto elevate. Il trattamento loco-regionale standard delle forme iniziali è costituito dalla chirurgia conservativa associata alla radioterapia o dalla mastectomia<sup>1</sup>.

I carcinomi della mammella costituiscono un gruppo eterogeneo di tumori caratterizzati da una marcata variabilità di presentazione clinica, comportamento biologico e risposta alla terapia.

Nella pratica clinica, la classificazione e la gestione del carcinoma mammario si basano principalmente sulle caratteristiche clinico-patologiche del tumore (morfologia, dimensioni, grado, stato linfonodale, immunofenotipo). Queste caratteristiche, tuttavia, a parità di stadio tumorale e anche nell'ambito di tumori simili sul piano immuno-morfologico, non sono risultate sufficienti per l'ottenimento di informazioni prognostiche e predittive sempre precise.

Nel corso degli ultimi anni, il profilo immunofenotipico del carcinoma della mammella ha assunto grande importanza prognostica e predittiva.

Tra i marcatori che di volta in volta sono stati identificati e proposti, il recettore per estrogeni (ER), il recettore per il progesterone (PgR) e l'HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) hanno assunto un ruolo cardinale nella formulazione prognostica, in quanto correlati ad alcune caratteristiche intrinseche della neoplasia (grado di differenziazione, attitudine all'invasività, tendenza alla metastatizzazione a

distanza) ma soprattutto collegati alla possibilità di un approccio terapeutico sistemico che sfrutti gli assi legati ai recettori ormonali (terapia anti-ormonale) o l'utilizzo di anticorpi monoclonali (anti-HER2)<sup>2,3</sup>.

Tuttavia, è diventato sempre più evidente come all'interno di ciascun gruppo di tumori esista una eterogeneità clinica, patologica e molecolare; cioè, carcinomi mammari con profili ER e HER2 simili possono avere differente esito clinico e mostrare caratteristiche patologiche e profili molecolari diversi.

Da qui l'esigenza di strumenti prognostici e predittivi ancora più efficienti ed efficaci, che ha costituito uno stimolo per lo studio delle caratteristiche genetiche e bio-molecolari delle cellule neoplastiche ma anche di ciò che apparentemente è non-neoplastico.

È opportuno, infatti, considerare che nel determinismo del comportamento biologico di una neoplasia entrano in gioco altri aspetti, oltre a quelli già noti e legati essenzialmente a caratteristiche intrinseche alla cellula neoplastica, in particolare la reazione stromale elicitata dal clone, fenomeno che prende il nome di stromatogenesi neoplastica e che comprende tra i fenomeni più noti la neoangiogenesi tumorale, ma anche la risposta del sistema immunitario; peraltro, i due fenomeni non sono da considerare eventi indipendenti. Il processo di stromatogenesi implica sia un rimodellamento di strutture preesistenti sia la formazione di nuove strutture. L'interazione tra cellule tumorali e stromali tumore-associate rappresenta l'elemento chiave per la sopravvivenza, la crescita, l'invasività e la capacità di metastatizzare. Ad oggi, tra questi fenomeni, quello più studiato è stato quello della vasculogenesi<sup>4</sup>, che rappresenta attualmente un bersaglio terapeutico in diverse neoplasie. Gli elementi vascolari non rappresentano, tuttavia, l'unica quota mesenchimale degna di nota nell'ambito dello stroma neoplastico.

È stato descritto infatti un ruolo importante nella progressione neoplastica di alcuni fibroblasti, denominati CAF, con un fenotipo attivato e che sembrano essere indotti direttamente dal clone neoplastico a partire da elementi mesenchimali residenti o da precursori circolanti; questi stessi elementi sono in grado di indurre nel clone neoplastico modificazioni, come i fenomeni di transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e soprattutto sostengono la proliferazione e la sopravvivenza del clone stesso attraverso un continuo cross-talk mediato da citochine e fattori di crescita<sup>5</sup>. L'interazione tra cellule tumorali e

cellule stromali tumore-associate rappresenta l'elemento chiave per la sopravvivenza, la crescita, l'invasività e la capacità di metastatizzare.

La stromatogenesi neoplastica deve essere distinta dalla fibrosi reattiva usuale che circonda le neoplasie benigne (capsula fibrosa) e dal tessuto connettivo avascolare che si forma per colmare una perdita di sostanza (fibrosi cicatriziale). Lo stroma neoplastico neoformato, essendo una struttura differente rispetto ai tessuti normali, ha la funzione di facilitare l'invasione delle cellule tumorali e la migrazione delle cellule endoteliali, ma non limita né ritarda in nessun modo il processo neoplastico<sup>5</sup>.

L'idea che l'interazione tra cellule neoplastiche e stroma svolga un ruolo fondamentale nei processi di cancerogenesi è nota da diverse decadi. Studi più recenti hanno dimostrato come lo stroma normale sia in grado di determinare la differenziazione delle cellule maligne<sup>6,7</sup>.

Dalle acquisizioni della letteratura scientifica degli ultimi anni è inoltre emerso prepotentemente il ruolo del sistema immunitario, e in particolare la tipologia di infiltrato e la sua localizzazione rispetto al tessuto neoplastico, quello che, nel suo insieme, viene definito contesto immunologico della neoplasia. Il contesto immunologico può essere valutato, ad esempio, mediante la formulazione di uno score, definito appunto immunoscore, proposto da Gèrome Galon nei carcinomi colon-rettali, che si basa sulla quantificazione dell'infiltrato CD3 totale e CD8 in specifiche aree del tumore. A seconda della tipologia e della localizzazione dell'infiltrato immunitario è possibile attualmente ottenere utili informazioni prognostiche e predittive<sup>8</sup>.

Un ulteriore aspetto ancora poco studiato nei carcinomi della mammella è il recettore androgenico; quest'ultimo, espresso dalle cellule epiteliali dell'unità duttulo-lobulare terminale, è implicato nello sviluppo della ghiandola mammaria e in particolare nella proliferazione dei dotti, potendo svolgere un ruolo nella genesi di alcune forme carcinomatose, rappresenterebbe inoltre un potenziale bersaglio di terapia mirata, soprattutto nei carcinomi triplo-negativi<sup>9</sup>. La sua valutazione nella pratica clinica potrebbe pertanto fornire utili informazioni per eventuali trattamenti sperimentali, già oggetto di studio in alcune istituzioni.

## **1.1 Classificazione molecolare dei carcinomi della mammella e correlazioni immunomorfologiche**

La prima pionieristica classificazione molecolare del carcinoma mammario è stata sviluppata da Perou et al. nel 2000<sup>2</sup>, che eseguirono un'analisi con la tecnica del cDNA microarray su 65 campioni di 42 pazienti. In questo studio, vennero identificati quattro sottotipi molecolari intrinseci di carcinomi della mammella: "luminal", "HER2-enriched", "basal like" e "normal breast-like", con comportamento biologico, fattori di rischio, storia naturale, risposta alla terapia e prognosi differenti.

Un anno dopo, Sorlie et al<sup>2</sup> eseguirono 85 analisi di cDNA microarray su 78 campioni di carcinoma mammario, affinando ulteriormente la classificazione molecolare intrinseca, proponendo la divisione del gruppo "luminal" in "luminal A" e "luminal B", mentre veniva escluso il gruppo normal breast like, trattandosi di un artefatto, dovuto alla presenza di abbondanti quote di tessuto mammario normale nei campioni esaminati.

Grazie a questi studi è stato possibile identificare dei pattern genici intrinseci che regolano l'espressione di ER, PgR ed HER2, rendendo l'approccio molecolare come una delle metodiche più importanti nello studio dei carcinomi della mammella, in grado di fornire informazioni fondamentali sia per una nuova tassonomia e classificazione che per una più approfondita conoscenza dei meccanismi biologici che contraddistinguono queste diverse forme di neoplasie<sup>2,3</sup>.

Si riportano di seguito le principali caratteristiche dei quattro sottotipi molecolari intrinseci.

### Luminal A

Costituiscono circa il 50% dei carcinomi della mammella. Morfologicamente sono caratterizzati da un miglior grado di differenziazione (G1-G2 secondo il sistema combinato di Nottingham), basso indice mitotico e scarsa attività proliferativa<sup>10,11</sup>. Per quanto concerne gli istotipi, appartengono a questo gruppo: carcinomi duttali invasivi NST, lobulari invasivi, tubulari, cribriformi e mucinosi<sup>10-12</sup>.

Sul piano immuno-fenotipico, vengono definiti Luminal A quei carcinomi che esprimono i recettori ormonali (ER positivi e PgR positivi) con HER2 negativo (score 0 o 1+ secondo

le più recenti linee guida proposte dall'ASCO/CAP 2018) e indice di proliferazione (Ki-67) < 14%<sup>13</sup>.

Questi tumori sono inoltre caratterizzati da una buona prognosi, con una sopravvivenza libera da recidive dell'80% a tre anni<sup>8</sup>. Infatti, in virtù della positività dei recettori ormonali, si osserva generalmente una ottima risposta al trattamento sistemico anti-ormonale. I carcinomi appartenenti al gruppo Luminal Epithelial A sono caratterizzati dall'espressione di gruppo di geni che configura il cluster ER quali GATA binding protein 3, X-box binding protein 1, trefoil factor 3, hepatocyte nuclear factor 3 $\alpha$ , LIV-1 protein estrogen regulated, Acyl CoA dehydrogenase<sup>2</sup>. Studi successivi hanno evidenziato l'espressione di ulteriori geni, quali c-kit, hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor-binding protein-3, ATF-3, componenti del sistema di fattori di trascrizione AP-1 come c-fos, c-jun, fosB, jun-D; di contro è stata rilevata una bassa/assente espressione di geni correlati alla crescita cellulare quali la topoisomerasi II, mitotic kinesis-like protein-1, PCNA, CDC2, BUB1 e MAD2L1<sup>14</sup>.

### Luminal B

I "Luminal B" costituiscono circa il 20% dei carcinomi mammari. Sono caratterizzati da una variabile espressione di ER e soprattutto di HER2, mostrano, a differenza dei Luminal A, un più basso grado di differenziazione ed una prognosi peggiore, caratterizzata da un tasso di sopravvivenza libera da malattia del 40% a dieci anni<sup>10,11,14</sup>. Le categorie istomorfologiche dei tumori con signature molecolare tipo Luminal B non sono sostanzialmente dissimili da quelle dei tumori Luminal A, con netta prevalenza degli istotipi duttali NST, lobulari e di alcune altre forme speciali, tra cui il carcinoma micropapillare<sup>10-12</sup>. Sul piano immuno-fenotipico, mostrano positività per ER e PgR. Riguardo l'espressione di Her2 e Ki67 si distinguono due sottogruppi: (1) HER2 negativi: tumori che esprimono i recettori ormonali (ER positivi e/o PgR positivi) con indice di proliferazione (Ki67)  $\geq 14\%$ ; (2) HER2 positivi: tumori che esprimono i recettori ormonali (ER positivi e/o PR positivi) e che presentano l'iperespressione della proteina HER2 o l'amplificazione del gene HER2/neu, indipendentemente dall'indice di proliferazione valutato con Ki67.

Ne consegue che tali neoplasie mostreranno una diversa risposta alla terapia sistemica. Infatti, si osserva una discreta risposta all'ormonoterapia, comunque leggermente

inferiore rispetto ai luminal A, e una maggiore risposta alla chemioterapia, in virtù dell'indice proliferativo generalmente più elevato.

Dal punto di vista molecolare, questo sottogruppo è identificato dall'espressione di proteine tirosin-fosfatasi tipo IV A, tumor necrosis factor receptor-associated factor 3, RAD21, BRCA1-associated protein 1 (BAP1), XBP1, FOXA1, GATA3, TFF3 e da una bassa espressione di FGFR1, CXCR4, ATF-3 e VCAM1<sup>14</sup>.

### HER2 - enriched

Costituiscono il circa il 15% dei carcinomi della mammella. Differentemente dai sottotipi "luminal", questa categoria immunofenotipica non esprime i recettori ormonali e si caratterizza per la sola amplificazione del gene HER2.

Appartengono a questo sottotipo molecolare per lo più istotipi duttali NST scarsamente differenziati (G3), con alto indice di proliferazione ed elevata conta mitotica. Immunofenotipicamente, si osserva intensa e diffusa positività di membrana per HER2 (score 3+ ASCO7CAP 2018).

La prognosi è generalmente scarsa, sebbene tali carcinomi si possano giovare del trattamento con l'anticorpo monoclonale anti-HER2, Trastuzumab. Il trattamento prevede inoltre regimi chemioterapici a base di antracicline.

Sul piano genico, sono caratterizzati da una elevata espressione dei geni appartenenti all'HER2 amplicon (17q22.24) inclusi ERBB2, GRB7 insieme a geni coinvolti nel pathway di ras quali Ras-related GTPases, RALB e RAB6A, che spiegano la convergenza di neu e ras nella tumorigenesi mammaria<sup>14,15</sup>.

L'espressione dei geni per fibronectin 1 e syndecan 1 (CD138), insieme alla ridotta espressione di quelli per c-kit e c-myc differenziano questi tumori dai luminali, in particolar modo dai Luminal B positivi per HER2. Infatti, secondo alcuni studi, i carcinomi alla mammella luminal B [ER(+) ed HER2(+)] presentano alti livelli di geni spesso espressi dalle cellule epiteliali luminali normali, mentre i carcinomi HER2-enriched [ER(-) ed HER2(+)] presentano una forte espressione di geni caratteristici di progenitori di cellule staminali simili<sup>2,14-17</sup>. Questi studi rivelano inoltre che i carcinomi luminal B e i carcinomi HER2-enriched sono biologicamente differenti, mostrano, infatti, pattern di risposta alla chemioterapia, alla terapia mirata per HER2, tempi e siti di recidiva differenti.



### Basal-like

La definizione di basal-like deriva dall'analogia morfologica tra questi tumori e le cellule basali/mioepiteliali dell'epitelio mammario, analogia testimoniata sia a livello immunofenotipico (positività per le CK5/6) che genetico, per la concomitante espressione dei geni per le CK5, CK17, CK14, integrina  $\beta 4$  e laminina.

I carcinomi del tipo basal-like mostrano una parziale sovrapposibilità immunofenotipica e genetica con i tumori caratterizzati da mutazioni germline del BRCA1 e, sebbene la maggior parte delle neoplasie con caratteristiche basal-like non mostri una mutazione del BRCA1, è stato riscontrato in questa categoria di carcinomi uno stato disfunzionale del gene, legato verosimilmente a modificazioni epigenetiche<sup>18</sup>. Il gene BRCA1 svolge un ruolo nella differenziazione dell'epitelio mammario da cellule staminali/progenitrici ER- in cellule luminali mature ER+, e questo potrebbe giustificare il fenotipo ER- dei tumori associati a BRCA1 mutato o disfunzionale<sup>19</sup>.

Il sottogruppo molecolare basal-like dei carcinomi mammari si caratterizza per una relativa eterogeneità in termini trascrizionali e per una notevole aggressività da un punto di vista prognostico.

I tumori basal-like sono stati per molto tempo assimilati al gruppo dei carcinomi mammari triplo-negativi (Triple Negative Breast Cancer TNBC), in virtù della loro mancata espressione dei recettori ormonali (ER e PgR) e dell'HER2.

Successivamente alla classificazione di Perou, lo studio di Cheang et al.<sup>20</sup> identifica un panel di marcatori immunoistochimici, comprendente ER, PgR, HER2, CK5/6 ed EGFR che consente di identificare i tumori triplo-negativi con una specificità del 100% ed una sensibilità del 76%. Tramite l'utilizzo di questo panel anticorpale è stato quindi evidenziato quel gruppo di neoplasie ER-PgR-HER2-CK5/6+ EGFR+ (definito Core Basal) che è tipico di donne in giovane età e che presenta un alto grado istologico ed una prognosi marcatamente severa.

Questa sovrapposizione, effettuata assimilando dati immunoistochimici (che definiscono lo status di triplo-negativo) e dati generici (che identificano i tumori basal-like) in effetti ha ingenerato negli anni notevole confusione<sup>21</sup>.

Se le due categorie vengono considerate in maniera distinta, i tumori basal-like sono parte del più ampio gruppo dei TNBC e ne costituiscono il 70%, mentre il resto mostra

caratteristiche morfologiche, immunofenotipiche e prognostiche differenti dai carcinomi basali.

### Carcinomi triplo-negativi

I carcinomi della mammella triplo-negativi (TNBC) rappresentano il 10-17% di tutti i tumori della mammella e la variabilità tra le varie casistiche è associata alle metodiche ed ai cut-off utilizzati per la definizione della negatività ai tre marcatori.

Da un punto di vista epidemiologico, i TNBC sono presenti in una fascia di età differente rispetto ai tumori luminali, con picco di incidenza prima dei 50 anni <sup>22,23</sup>.

La loro notevole aggressività, testimoniata da un rischio di recidiva più alto nei primi tre anni <sup>24,25</sup>, da un alto tasso di mortalità entro i primi cinque anni e da una sopravvivenza ridotta a seguito del primo evento metastatico <sup>26</sup> è globalmente maggiore rispetto agli altri sottogruppi molecolari <sup>27</sup>, compreso il gruppo HER2.

Questo dato è stato ampiamente dibattuto e numerosi studi non evidenziano particolari differenze nell'incidenza di recidive e metastasi a distanza rispetto ai tumori non TNBC <sup>27</sup> o addirittura una associazione inversa <sup>28</sup>. A differenza dei tumori non TNBC, non sembra esistere una correlazione tra le dimensioni del tumore primitivo dei TNBC e la presenza di metastasi linfonodali <sup>25</sup>, in analogia a quanto accade nei tumori con mutazione di BRCA1 <sup>29</sup>.

Da un punto di vista istopatologico, i TNBC comprendono forme meglio differenziate ed altre caratterizzate da un marcato pleomorfismo e grado nucleare <sup>30-33</sup>.

Tra queste, si riconoscono carcinomi che mostrano il classico fenotipo basaloide caratterizzato da elementi di piccola/media taglia ad organizzazione organoide o solida, con palizzata periferica, alto grado istologico (G3 sec. Nottingham), scarsa formazione di tubuli, numerose figure mitotiche, talvolta atipiche (>25 per 10 HPF), foci di necrosi “a carta geografica” <sup>30,34,35</sup>.

Tali tumori esprimono le citocheratine basali CK5/6, CK14 e CK17 in maniera variabile, con maggiore espressione delle prime.

Alcuni tumori di tipo basaloide mostrano una differenziazione mioepiteliale, con concomitante espressione di actina muscolo liscio, CD10 o p63. Variabile è invece l'espressione delle cheratine luminali CK7, CK8/18 e CK19 e del c-kit <sup>34,36</sup>.

Nell'ambito dei carcinomi triplo-negativi esistono inoltre forme, come il carcinoma con aspetti midollari e il carcinoma adenoide-cistico, caratterizzate da un comportamento biologico meno aggressivo e con conseguenti caratteristiche prognostiche migliori.

Oltre ai carcinomi invasivi NST, infatti, appartengono al gruppo dei TNBC:

I carcinomi con aspetti midollari, caratterizzati da un'architettura di tipo sinciziale, con aspetti solidi o nastriformi, in cui le strutture ghiandolari rappresentano solo una minima percentuale del tumore; tali neoplasie sono costituite da elementi cellulari generalmente rotondeggianti od ovoidali, con abbondante citoplasma e nuclei vescicolosi con nucleoli evidenti. La proliferazione neoplastica è intervallata da bande di tessuto collagene associate ad un cospicuo infiltrato linfoplasmacellulare, con rara formazione di follicoli linfoidi o aspetti granulomatosi. I tumori midollari mostrano margini di tipo espansivo<sup>30</sup>. Il profilo immunofenotipico comprende l'espressione di CK di tipo luminale, incluse la 19; le classiche CK basali e l'EGFR sono espresse solo in una percentuale variabile di casi (30.3 – 60%)<sup>37,38</sup>.

I carcinomi metaplastici sono invece un gruppo eterogeneo di neoplasie caratterizzate da aree di adenocarcinoma intimamente interconnesse con aree a differenziazione squamosa o a cellule fusate (forme epiteliali pure), comprendenti talvolta zone a differenziazione eterologa condroide, ossea e rabdoide (carcinomi misti epiteliali e mesenchimali). Si tratta di tumori scarsamente differenziati e morfologicamente bizzarri, in cui la componente ghiandolare può rappresentare o la parte prevalente o quella minoritaria, come accade nelle forme squamose pure. Tale eterogeneità si ripercuote anche sul piano immunofenotipico, in quanto l'espressione di marcatori specifici (CK 34βE12 negli squamosi o nelle forme fusate a differenziazione squamosa, S100 nelle zone a differenziazione condroide) si associa all'espressione di alcuni marcatori di tipo basale, come l'EGFR<sup>39</sup>.

I carcinomi secretori composti da una popolazione relativamente monomorfa di cellule con nuclei blandi, nucleoli incospicui, attività mitotica minima ed accumulo intra e peri ghiandolare di materiale PAS+. Il tumore cresce in masse solide, separate da setti fibrosi con formazione di spazi cistici di dimensione variabile. L'espressione di S100 e CEA contraddistingue questa rara forma neoplastica<sup>40</sup>.

I carcinomi mioepiteliali mostrano carattere marcatamente infiltrante e sono composti unicamente da elementi mioepiteliali, prevalentemente fusati e talora epitelioidi, con modesta attività mitotica (3-4 mitosi per 10 HPF [high power field]) e ialinizzazione centrale, dovuta ad una marcata deposizione di collagene. Le cellule tumorali mostrano la caratteristica positività del mioepitelio per CD10 e p63 e sono negative per calponina e actina muscolo liscio<sup>30</sup>.

I carcinomi adenoide-cistici sono caratterizzati da una crescita cribriforme, trabecolare-tubulare e solida, costituita da due tipi cellulari, uno basaloide, all'interfaccia con lo stroma circostante, l'altro a morfologia cuboidale o più raramente fusata, in posizione luminale. Le cellule basali mostrano una chiara positività per actina muscolo liscio, calponina e CD14, le cuboidali secretorie sono invece CK7+. Queste neoplasie sono caratteristicamente c-kit positive<sup>41</sup>. La diagnosi differenziale talora si pone con forme ben differenziate di carcinoma invasivo, come il carcinoma cribriforme invasivo, o con lesioni mammarie a comportamento biologico benigno, come la sferulosa collagena, con la quale si osserva una notevole sovrapposizione morfologica e immunofenotipica, in questi casi l'impiego di marcatori immunoistochimici come CD10 e Actina muscolo-specifica (HHF35) possono aiutare nella diagnosi differenziale<sup>42</sup>.

Nel 2011, Lehmann et al.<sup>43</sup> hanno identificato sei sottotipi molecolari di TNBC:

- *Basal like 1*: caratterizzato da cellule che esprimono geni legati al ciclo cellulare (cycle-related gene expression),
- *Basal like 2*: mostra un'intensa espressione di geni coinvolti nella cascata del segnale di fattori di crescita (EGF, NGF, MET e IGF1R). Il sottotipo basal like 2 è caratterizzato da una differenziazione basale/mioepiteliale, con alti livelli di p63 e CD10.  
Sia i carcinomi mammary appartenenti al sottotipo BL1 che al sottotipo BL2 presentano alti livelli di Ki67,
- *Immunomodulante*: esprime geni coinvolti nella risposta immune e mostra una sostanziale sovrapposizione con il carcinoma mammario midollare, un carcinoma TNBC caratterizzato da una buona prognosi<sup>44</sup>.

- *Mesenchymal stem-like (MSL) e mesenchimale (M)*: esprimono geni responsabili della motilità cellulare e coinvolti nei pathway di differenziazione cellulare. Il sottotipo MSL rispetto al sottotipo M, mostra una minore espressione di geni responsabili della proliferazione cellulare e presenta caratteristiche molecolari del sottotipo claudin-low.

I tumori *claudin-low* sono caratterizzati da una bassa o assente espressione di marcatori di differenziazione luminale/ghiandolare, come la e-caderina e dalla sovra espressione di antigeni mesenchimali, come la vimentina, e sono ricchi di cellule staminali carcinomatose<sup>45</sup>. Questi tumori, si pensa costituiscano il 5-10% di tutti i carcinomi mammari, sono triplo-negativi e hanno un fenotipo basal-like<sup>46</sup>.

La maggior parte dei carcinomi claudin-low sono scarsamente differenziati, hanno una morfologia high-grade e sono ricchi di cellule infiammatorie<sup>47</sup>.

I carcinomi con caratteristiche simili hanno un alto potenziale metastatico e una cattiva prognosi<sup>48,49</sup>. Le caratteristiche morfologiche, immunofenotipiche e genetiche del carcinoma metaplastico sono coerenti con quelle dei tumori claudin-low<sup>45</sup>.

- *Luminal con recettore per gli androgeni (LAR)*: esprime la CK18 luminale e geni coinvolti in pathway ormonali, incluso il recettore per gli androgeni. Il sottotipo LAR corrisponde al sottotipo molecolare apocrino descritto negli studi di Farmer et al<sup>50</sup>.

Gli studi di Lehmann et al. indicano che ciascun sottotipo molecolare di TNBC presenta almeno un target differente con potenziali risvolti terapeutici.

Questo approccio potrebbe cambiare l'attuale teoria del "one size fits all" riguardo il regime chemioterapico di solito impiegato nel trattamento dei TNBC, rispetto ad una possibile e potenziale terapia mirata individuale basata su sottotipi molecolari specifici.

## 1.2 Stromatogenesi neoplastica

Le caratteristiche fondamentali che definiscono “maligno” il comportamento biologico delle neoplasie sono la capacità di invasione locale e di metastatizzare a distanza. Ancora oggi, gli esatti meccanismi di diffusione neoplastica rimangono sconosciuti.

Già nel 2001 era stato dimostrato che, in vitro, i fibroblasti normali prelevati da campioni di mastoplastica riduttiva erano in grado di inibire la crescita e il processo morfogenetico di cellule epiteliali displastiche. Al contrario, i fibroblasti prelevati da carcinomi mammari determinano uno stimolo proliferativo nelle cellule epiteliali duttali normali, portando alla formazione di dotti <sup>51</sup>.

Sono stati individuati, classicamente, alcuni dei meccanismi che regolerebbero la progressione neoplastica e in particolare: (a) la pressione meccanica prodotta dalla rapida proliferazione del clone neoplastico, che favorirebbe la diffusione delle cellule tumorali attraverso piani di minor resistenza tissutale<sup>52</sup>; (b) la riduzione della adesività tra le cellule tumorali, dovuta alla perdita di espressione di molecole di adesione come le caderine e le integrine<sup>53</sup>; (c) l'incremento della motilità cellulare, dovuta alla secrezione di citochine motogeniche (es. hepatocyte growth factor receptor [HGFR])<sup>54-59</sup>; (d) la degradazione della matrice cellulare a causa del rilascio di enzimi ad attività proteolitica, quali metalloproteasi, collagenasi, plasminogeno, catepsine<sup>56,60-62</sup>; (e) la stimolazione dell'angiogenesi, legata al rilascio di fattori neo-angiogenetici come VEGF e responsabile di un incremento delle possibilità di sopravvivenza del clone neoplastico consentendo un adeguato apporto ematico<sup>63,64</sup>.

Nonostante questi meccanismi siano tutti validi, non consentono di spiegare in maniera completa ed esaustiva il fenomeno di diffusione neoplastica.

Recentemente, particolare attenzione è stata posta nei confronti di un elemento finora ampiamente sottovalutato: lo stroma neoplastico e, conseguentemente, i meccanismi di stromatogenesi tumorale<sup>65-69</sup>.

### Stroma e carcinogenesi

L'idea che l'interazione tra cellule neoplastiche e stroma svolga un ruolo fondamentale nei processi di cancerogenesi è nota da diverse decadi. Negli anni '60 Redler et al dimostrarono che il derma peritumorale è in grado di stimolare la proliferazione dell'epidermide embrionale<sup>70</sup>. Nello stesso periodo Dawe et al dimostrarono che il

Polioma virus poteva indurre trasformazione neoplastica nella ghiandola sottomandibolare solo quando l'epitelio ghiandolare entrava in contatto con cellule mesenchimali stromali<sup>71</sup>. Studi più recenti hanno dimostrato come lo stroma normale sia in grado di determinare la differenziazione delle cellule maligne<sup>6,7</sup>. Ad esempio, nel processo di cancerogenesi prostatica, le cellule acinari dell'iperplasia benigna possono andare incontro a trasformazione maligna solo in presenza di cellule mesenchimali del seno urogenitale, in topi trattati con testosterone ed estradiolo<sup>72</sup>; la perdita di responsività al TGF $\beta$  nei fibroblasti comporterebbe l'insorgenza di neoplasia prostatica intraepiteliale<sup>73</sup>. Olumi et al hanno dimostrato che i fibroblasti ottenuti dal carcinoma prostatico promuovono la trasformazione neoplastica di cellule acinari immortalizzate derivanti dall'iperplasia prostatica benigna<sup>74</sup>.

Anche nella carcinogenesi della mammella lo stroma potrebbe giocare un ruolo fondamentale. Negli esperimenti condotti da Shekhar et al, i fibroblasti normali prelevati da campioni di mastoplastica riduttiva inibiscono la crescita e il processo morfogenetico di cellule epiteliali preneoplastiche, mentre i fibroblasti prelevati da carcinomi mammari determinano uno stimolo proliferativo con formazione di dotti nelle cellule epiteliali duttali normali<sup>75</sup>.

#### Stroma e progressione tumorale

L'interazione tra cellule tumorali e cellule stromali tumore-associate potrebbe rappresentare l'elemento chiave per la sopravvivenza, la crescita, l'invasività e la capacità di metastatizzare.

La presenza di fibroblasti tumore-associati attivati correla positivamente con un'aumentata capacità metastatica nei carcinomi umani<sup>76</sup>.

La co-coltura di fibroblasti polmonari con linee cellule di adenocarcinoma polmonare esita in un incremento del tasso di proliferazione cellulare; tale effetto è stato attribuito al rilascio di anfiregulina e TGF $\alpha$  da parte dei fibroblasti<sup>77</sup>.

#### Definizione di stromatogenesi neoplastica

La stromatogenesi è definita come la formazione di un nuovo stroma di tipo specifico, composto essenzialmente da fibroblasti e matrice extracellulare, nelle sedi di invasione

tumorale e nei siti di metastasi, come parte integrante del processo di infiltrazione tumorale<sup>65</sup>.

La stromatogenesi neoplastica deve essere distinta dalla fibrosi reattiva usuale che circonda le neoplasie benigne (capsula fibrosa) e dal tessuto connettivo avascolare che si forma per colmare una perdita di sostanza (fibrosi cicatriziale). Lo stroma neoplastico neoformato, essendo una struttura differente rispetto ai tessuti normali, ha la funzione di facilitare l'invasione delle cellule tumorali e la migrazione delle cellule endoteliali, ma non limita né ritarda in nessun modo il processo neoplastico<sup>78,79</sup>.

### Tipologie di stromatogenesi

Lo stroma tumorale neoformato è osservabile in tre contesti principali: (1) in corrispondenza del fronte di avanzamento di tumori con modalità di crescita endofitica, (2) nelle superfici libere di tumori a crescita esofitica e (3) nei siti di metastasi<sup>65</sup>.

Lo stroma neoplastico presente nelle porzioni più centrali del tumore primitivo rappresenta un processo secondario, conseguente alla graduale incorporazione della periferia tumorale, a causa della crescita neoplastica continua.

Un'altra forma, meno usuale, di stromatogenesi tumorale è rappresentata dalla neoangiogenesi pura; i vasi neoformati sono costituiti da cellule endoteliali circondate da componenti connettivali (lamina basale, fibre reticolari, periciti e fibroblasti).

- *Stromatogenesi nel fronte di avanzamento tumorale.* I tessuti normali, generalmente, si comportano come una barriera fisica in grado di prevenire l'invasione neoplastica e l'espansione tumorale intramurale. Lo stroma neoformato, essendo interposto tra spazi intercellulari, fessure naturali e piani tissutali di minore resistenza, dove normalmente sono presenti solo esigue quantità di tessuto connettivo lasso, interrompe la continuità delle normali strutture tissutali favorendo in questo modo l'infiltrazione delle cellule neoplastiche.
- *Stromatogenesi nella superficie libera del tumore.* I tumori a crescita esofitica non possono crescere all'interno di spazi vuoti né raggiungere grandi dimensioni finché non creano un proprio substrato stromale; lo stroma neoformato sostiene le cellule tumorali rappresentando il supporto per una espansione tumorale potenzialmente infinita. In questo contesto, la formazione di un nuovo stroma di



tipo specifico è determinata da meccanismi di ulcerazione, emorragia e formazione di trombi, cui fa seguito la proliferazione e la migrazione di fibroblasti. L'accumulo di piastrine infatti contribuisce in maniera significativa alla proliferazione fibroblastica e alla stabilizzazione del trombo<sup>80</sup>. Tale stroma neofornato potrà essere infiltrato facilmente dalle cellule neoplastiche.

- *Stromatogenesi nei siti di metastasi.* La stromatogenesi è un evento particolarmente frequente nelle sedi di localizzazione metastatica. Tuttavia, non è chiaro se la formazione di tale neostroma dipenda dai fibroblasti locali (elementi connettivali derivati dalla capsula e dai setti fibrosi) o derivi dal trasporto passivo con conseguente impianto di elementi connettivali, rimasti intrappolati nell'embolo neoplastico (lamina basale, fibre reticolari, periciti e fibroblasti perivascolari)<sup>65</sup>.
- *Angiogenesi come forma primitiva di stromatogenesi.* In alcune neoplasie maligne, in particolare alcune forme endocrine, neuroendocrine ed embrionali, la stromatogenesi tumorale è rappresentata esclusivamente da una densa rete di piccoli capillari costituiti da cellule endoteliali associate ad un esile strato di elementi connettivali. Tale network vascolare, oltre ad espletare la sua normale funzione di supporto trofico, ha la funzione di fornire un substrato di supporto per le cellule tumorali con lo scopo di mantenere l'integrità della massa neoplastica in continuo accrescimento. Rimane ancora da chiarire il motivo per cui, in questi casi, non si verifichi l'attivazione dei fibroblasti peritumorali né di altri elementi connettivali, ma solo di cellule endoteliali.

### Istologia del neostroma

Lo stroma tumore-associato neofornato è costituito da una componente cellulare e da matrice extracellulare. Le cellule stromali sono rappresentate da elementi fusati, a morfologia prevalentemente simil-miofibroblastica; in corrispondenza del fronte di avanzamento tumorale la matrice extracellulare è costituita per lo più da tessuto connettivo lasso, edematoso e vascolarizzato, mentre le porzioni centrali del tumore si caratterizzano per la presenza di tessuto connettivo denso e compatto scarsamente vascolarizzato<sup>65,81</sup>.

I fibroblasti attivati deriverebbero da fibroblasti tissutali normalmente presenti; tuttavia, diverse evidenze sperimentali suggeriscono che anche il midollo osseo contribuirebbe all'arricchimento della popolazione stromale per mezzo di precursori miofibroblastici<sup>82</sup>.

I fibroblasti associati al tumore mostrano un immunofenotipo differente rispetto a quello riscontrato nella fibrosi reattiva e sono stati, pertanto, definiti con e fibroblasti associati al tumore (Cancer Associated Fibroblasts - CAF)<sup>83</sup>.

Le cellule fusate del neostroma, o CAFs, si caratterizzano per l'espressione di  $\alpha$ SMA, indicativa del passaggio da un fenotipo fibroblastico (fibrosi reattiva) a miofibroblastico (stromatogenesi), per la perdita di espressione di desmina, miosina, laminina ed aumentati livelli di vincolina<sup>83</sup>.

La proteina di attivazione fibroblastica (FAP) è espressa nei fibroblasti attivati, sia in condizioni benigne che maligne<sup>84</sup>.

Gli elevati livelli di Ki67 riscontrati nelle cellule fusate peritumorali, paragonato con fibroblasti di controllo, testimoniano l'intenso ritmo proliferativo di queste cellule<sup>66</sup>.

Il processo di infiltrazione neoplastica è inoltre facilitato da SPARC, espresso ad elevati livelli sia nelle cellule fusate peritumorali sia a livello della matrice extracellulare, promuovendo la motilità cellulare e l'invasione stromale<sup>85,86</sup>.

I collagene di tipo III e di tipo XIII, abbondantemente presenti nella matrice extracellulare del neostroma, rappresentano forme immature di collagene, pertanto più facilmente permeabili dalle cellule neoplastiche e dalle cellule endoteliali<sup>81</sup>. Di contro, il collagene di tipo I, componente principale del tessuto connettivo normale, è più maturo, mostra una struttura più compatta e, in sinergia con la fibronectina, risulterà meno permeabile nei confronti all'infiltrazione neoplastica<sup>87</sup>.

Le metalloproteasi presenti nella matrice extracellulare contribuiscono in maniera significativa alla "meccanica" del neostroma, facilitando l'invasione neoplastica<sup>88,89</sup>.

Recentemente, Shuler et al hanno messo in evidenza un possibile ruolo da parte dei recettori per citochine specifiche: in particolare, i fibroblasti del neostroma perderebbero l'espressione di IL4R, mentre aumenterebbero i livelli di espressione di recettori ad attività tirosin-chinasica come i PDGFRs<sup>76,90,91</sup>.

Tali aspetti sarebbero specifici del neostroma non essendo riscontrabili nelle fibrosi reattive, come il tessuto cicatriziale o la capsula fibrosa delle lesioni benigne; in questi ultimi contesti, infatti, le cellule fusate stromali usualmente esprimono vimentina,

raramente  $\alpha$ SMA, risultano negative per SPARC e mostrano un'attività proliferativa molto bassa<sup>65</sup>.

#### Possibili meccanismi di attivazione fibroblastica

I meccanismi di attivazione fibroblastica nel processo neoplastico rimangono in larga parte da chiarire. Le citochine e i fattori di crescita, rilasciati dalle cellule tumorali e dai macrofagi associati al tumore, rappresentano gli stimoli in grado di stimolare e sostenere l'indirizzo strutturale e funzionale dei fibroblasti. Nonostante i fibroblasti residenti costituiscano la risorsa più ovvia per la formazione del neostroma, è ipotizzabile anche un ruolo da parte dei precursori mesenchimali midollari reclutati nel sito tumorale<sup>92,93</sup>.

Tra i fattori di crescita, uno dei ruoli principali sarebbe svolto dal TGF $\beta$ 1, responsabile della differenziazione dei fibroblasti quiescenti in miofibroblasti<sup>94,95</sup>. Le cellule neoplastiche producono abbondanti quantità di TGF $\beta$ 1, soprattutto sul fronte di avanzamento tumorale, dove si verificano le interazioni con i fibroblasti residenti<sup>96</sup>.

Le isoforme di PDGF agiscono stimolando la proliferazione e la migrazione dei miofibroblasti; l'attività di PDGF si esplica attraverso i recettori ad attività tirosin-chinasica PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$  presenti sulla superficie dei fibroblasti stimolati<sup>97</sup>. In modelli sperimentali è stato dimostrato che PDGF svolge, infatti, un ruolo essenziale nella risposta desmoplastica<sup>98</sup>.

VEGF, potente fattore angiogenetico prodotto dalle cellule tumorali, interagendo con VEGFR2 espresso dai fibroblasti, promuove la stromatogenesi neoplastica in diversi carcinomi<sup>99,100</sup>.

#### Funzione metabolica del neostroma

Esistono in letteratura diverse evidenze sul ruolo di supporto metabolico da parte del microambiente stromale nei confronti del "parenchima neoplastico".

Le cellule tumorali sono caratterizzate da un metabolismo prevalentemente anaerobico. I fibroblasti stromali e la vascolarizzazione sono in grado di supportare l'attitudine delle cellule neoplastiche all'anaerobiosi, tamponando e catabolizzando i prodotti del metabolismo anaerobico. Studi condotti sull'espressione delle forme isoenzimatiche della lattico-deidrogenasi (LDH) hanno evidenziato nelle cellule tumorali una netta prevalenza dell'isoforma LDH5, deputata alla conversione dell'acido piruvico in acido lattico,

mentre nei fibroblasti tumore-associati si riscontrerebbero abbondanti quantità dell'isoforma LDH1, la cui attività si esplica nella riduzione dell'acido lattico in acido piruvico<sup>101</sup>. Tali dati suggeriscono che il metabolismo delle cellule tumorali e dello stroma tumore-associato siano complementari e che, quindi, il neostroma neoplastico rappresenti un substrato metabolicamente attivo, necessario per la sopravvivenza e la crescita neoplastica<sup>69</sup>.

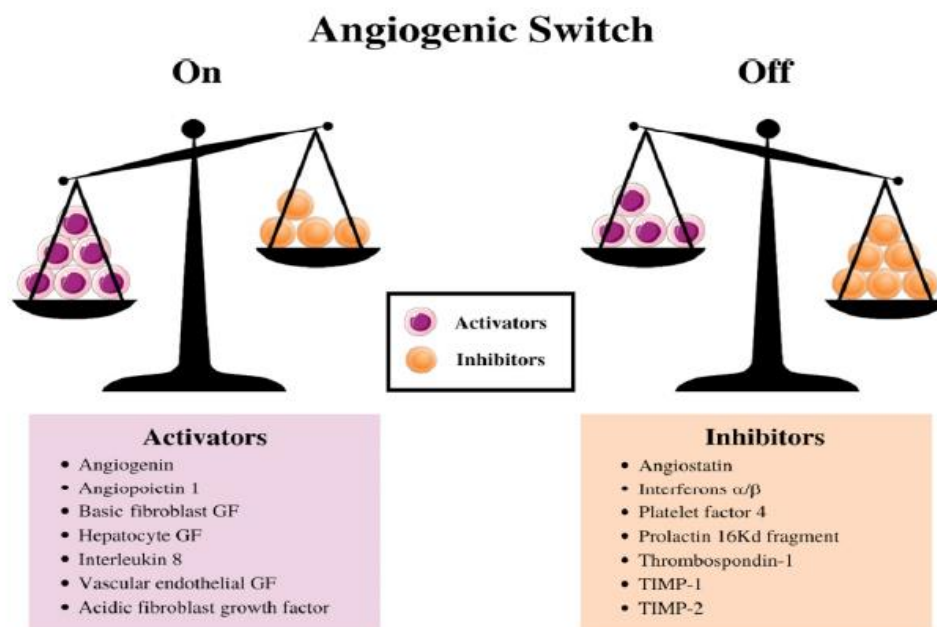
### Neoangiogenesi tumorale

La neoangiogenesi, definita come la rapida crescita di nuovi vasi sanguigni, è richiesta per garantire il sufficiente apporto di ossigeno e di nutrienti necessari per la crescita tumorale.

Le cellule del carcinoma mammario, analogamente alle cellule degli altri tessuti, necessitano di un costante apporto di nutrienti e ossigeno attraverso una rete di vasi capillari<sup>102</sup>. Questi capillari, normalmente, non proliferano poiché le cellule endoteliali che ne rivestono la superficie interna non sono mitoticamente attive. Bassi livelli di ossigeno (ipossia) sono in grado di innescare numerose risposte trascrizionali, mediate da fattori di trascrizione definiti fattori inducibili dall'ipossia (HIFs). Questi fattori di trascrizione regolano l'espressione di numerosi geni implicati nella stimolazione di specifiche risposte fisiologiche, quali metabolismo, angiogenesi e divisione cellulare. La neoangiogenesi locale rappresenta uno dei principali meccanismi di adattamento primario a lungo termine da parte del microambiente tumorale<sup>103</sup>. Il meccanismo coinvolge i precursori delle cellule endoteliali che daranno origine a plessi capillari con successiva differenziazione in vasi capillari; tale fenomeno si verifica in numerosi processi fisiologici, come lo sviluppo embrionale, l'accrescimento corporeo e la guarigione delle ferite<sup>104</sup>. La neoangiogenesi rappresenta un passaggio cruciale nello sviluppo, nella progressione e nelle metastasi dei tumori solidi<sup>105</sup>. Nelle fasi iniziali, il tumore non stimola l'angiogenesi e, a causa del basso apporto di nutrienti e ossigeno, la massa neoplastica rimane limitata a pochi millimetri di diametro<sup>106,107</sup>. In questa fase precoce, infatti, il tumore sembra rimanere in una fase di stasi, in cui il tasso di morte cellulare controbilancia il tasso di proliferazione, in parte dovuto allo stato di ipossia relativa e, quindi, alla relativa insufficienza di nutrienti nel microambiente circostante<sup>108</sup>. Di conseguenza, il tumore attiva un programma pro-angiogenetico evolvendo in uno stato irreversibile di attiva neoangiogenesi<sup>109</sup>; tale nuova condizione conferisce alla massa

neoplastica la capacità di rifornirsi di un adeguato supporto di ossigeno e nutrienti, portando ad una rapida crescita<sup>110</sup>.

L'iniziazione e la progressione della neoangiogenesi tumorale sono legate all'azione di fattori di crescita, tra cui VEGF e FGF<sup>111-114</sup>; si tratta di processi finemente regolati, legati a un complesso sistema di segnali bilanciati tra fattori pro- e anti-angiogenetici, in cui il microambiente svolge un ruolo cruciale, come esposto nei precedenti paragrafi, che porterà alla formazione di una nuova e stabile rete vascolare<sup>115</sup> [Figura 1.1].



**Figura 1.1:** Diagramma schematico che illustra l'ipotesi di equilibrio dello switch angiogenico. Si ipotizza che un meccanismo di commutazione dell'angiogenesi regoli strettamente l'angiogenesi normale (formazione di nuovi capillari). Questo equilibrio può essere interrotto per favorire una maggiore formazione dei vasi sanguigni attraverso induttori e inibitori dell'angiogenesi, che attivano lo switch. La riduzione della concentrazione di inibitori, e.g., thrombospondin-1, 16kD prolactin, Interferon  $\alpha\beta$ , Platelet factor-4, Angiostatin, etc. o l'incremento dei livelli di attivatori, e.g., aFGF, bFGF, VEGF, etc., determina un cambiamento del bilancio e attiva lo switch, portando alla proliferazione di nuovi vasi sanguigni<sup>4,110</sup>. Modificata: da Madu CO, Wang S, Madu CO, Lu Y. Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. *J Cancer*. 2020; 11(15): 4474–4494.

Diversi studi hanno dimostrato come i livelli di fattori angiogenetici, e di conseguenza dell'entità della vascolarizzazione intra- e peritumorale, rappresentino un fattore prognostico e predittivo nel carcinoma della mammella<sup>116-118</sup>. In altri termini, una ricca vascolarizzazione tumorale rappresenta la manifestazione della natura aggressiva della neoplasia e correla con una prognosi relativamente peggiore<sup>119-121</sup>.

### Risvolti terapeutici

La conoscenza del ruolo della stromatogenesi neoplastica e, conseguentemente, dei meccanismi che la governano ha aperto la strada a nuovi approcci terapeutici anti-neoplastici.

I farmaci anti-angiogenetici e gli inibitori degli enzimi coinvolti nelle interazioni tra stroma e cellule neoplastiche sono oggetto di studi clinici ed hanno in alcuni casi prodotto importanti benefici<sup>122-124</sup>.

Tra i farmaci anti-angiogenetici, il più studiato è il Bevacizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato antiVEGF. Nel 2008, la FDA ha approvato il bevacizumab per il trattamento del carcinoma metastatico della mammella Her2-negativo, grazie ai promettenti risultati ottenuti da trials preclinici<sup>125,126</sup>; in seguito, sono state approvate diverse altre molecole anti-angiogenetiche, aventi come bersaglio il VEGF o il suo recettore, per il trattamento di diverse neoplasie<sup>127,129</sup>. Nel 2011, tuttavia, la FDA ha ritirato l'approvazione di tali molecole a causa di risultati contraddittori tra diversi studi e a causa di una elevata tossicità, pertanto l'impiego di tali farmaci è divenuto oggetto di controversie<sup>130,131</sup>.

Recentemente, anche i fibroblasti tumore-associati sono divenuti bersaglio di potenziali trattamenti anti-neoplastici. Sfruttando le differenze fenotipiche e funzionali tra fibroblasti normalmente presenti nei tessuti e fibroblasti del neostroma, potrebbero essere individuati target molecolari specifici, limitando in questo modo la tossicità sui tessuti normali.

Studi sperimentali su modelli animali di carcinoma del colon-retto hanno evidenziato che l'inibizione dell'attività dei recettori per PDGF (es. imatinib, sunitinib), espressi nei fibroblasti associati al tumore, determina una riduzione della crescita neoplastica, potenziando l'efficacia dei chemioterapici anti-neoplastici tradizionali<sup>132</sup>.

### 1.3 Contesto immunologico tumorale

Il tumore è un sistema dinamico che, tramite caratteristiche di immunogenicità, instaura un rapporto con il sistema immunitario. Il sistema immunitario, attraverso interazioni dinamiche continuate nel tempo, modella il processo evolutivo del cancro, in un processo che prende il nome di *immunoediting*. L'*immunoediting* prevede che inizialmente il sistema immunitario abbia un ruolo antitumorale protettivo, che si esplica mediante la distruzione delle cellule tumorali immunogeniche. Successivamente, però, in seguito a questa risposta immune nei confronti del tumore, l'immunogenicità della neoplasia viene modellata proprio dalla risposta immune facilitandone così la progressione. Questo processo si esplica in tre fasi; le tre E *dell'immunoediting*, ovvero *elimination*, *equilibrium* ed *escape*<sup>133</sup>. L'*immunoediting*, inoltre, è un processo che ha luogo anche durante l'immunoterapia, la quale ha lo scopo di rafforzare la risposta immunitaria endogena che da sola risulta inefficace<sup>134,135</sup>. Pertanto si è passati dal concetto di immunosoppressione (da parte del sistema immunitario nei confronti del tumore) al concetto di *immunoediting*. Anche lo stroma, attraverso un processo di *crosstalking*, interagisce col tumore, condizionandone l'eterogeneità e la capacità di modulare la risposta immune<sup>136</sup>. Altri due elementi che modulano il sistema immunitario sono l'ipossia e il microbioma. L'ipossia contribuisce a rendere inefficace la risposta immunitaria endogena intratumorale. L'ipossia nel TME colpisce tutte le cellule ivi presenti, tuttavia le cellule tumorali presenti nelle zone ipossiche sono più aggressive e, di conseguenza più resistenti all'immunoterapia<sup>137</sup>. Per quanto concerne il microbioma, il suo ruolo ha avuto sempre più risalto negli ultimi anni. Il microbioma plasma il sistema immunitario dalla nascita e per tutta la vita, contribuendo alla programmazione delle risposte immunitarie innate e adattive locali e sistemiche, al punto che qualsiasi disbiosi intestinale può condurre a infiammazione sistemica e cancro<sup>138,139</sup>.

A modulare la risposta immune nel contesto del microambiente tumorale contribuiscono, inoltre, le strutture linfoidi terziarie, che possono trovarsi all'interno del tumore o alla sua periferia. Le strutture linfoidi terziarie si formano ex novo, come risposta al tumore, e possono avere un comportamento ambiguo in termini prognostici; esse infatti possono fungere da attivante immunitario, promuovendo l'attivazione in situ dei linfociti e promuovendone un comportamento antitumorale. Tuttavia le strutture linfoidi terziarie possono anche associarsi a prognosi sfavorevole in presenza cellule T regolatorie (Treg)

o qualora esprimano geni associati all'infiammazione<sup>140,141</sup>. Quindi il ruolo prognostico delle strutture linfoidi terziarie varia in base alla tipologia delle cellule immunitarie ivi presenti. La valutazione delle strutture linfoidi terziarie, in associazione con la valutazione dell'immunoscore (tipo, posizione e densità delle cellule immunitarie intratumorali) fornirebbe pertanto una stima prognostica abbastanza completa del tumore, utile sia in ambito diagnostico che terapeutico<sup>142</sup>. La comprensione di questi complessi meccanismi di interazione tra cellule immunitarie tumore-associate e cellule tumorali fornisce il razionale per l'applicazione di immunoterapie al carcinoma della mammella, così da combinare immunoterapie e terapie mirate per prevenire o neutralizzare le vie immunosoppressive e ottenere un microambiente tumorale che favorente l'immunità anti-neoplastica. Comprendere i meccanismi attraverso i quali le cellule tumorali e cellule immunitarie comunicano permette di indentificare biomarker utili ai fini prognostici e predittivi nel carcinoma della mammella, al fine di progettare terapie mirate e di riconoscere quelle pazienti che potranno o meno trarre benefici da determinati trattamenti combinati<sup>143</sup>.

### 1.3.1 Elementi cellulari del contesto immunologico tumorale

Come detto il processo di immunoediting prevede un'interazione dinamica e continua tra le cellule tumorali e le cellule immunitarie intratumorali, in particolare TILs (Linfociti infiltranti il tumore) e TIIC. Le cellule immunitarie intratumorali possono essere grossolanamente suddivise in due categorie, la prima comprende le cellule immunitarie che esplicano una funzione di immunosorveglianza, quali:

- Linfociti T helper 1 (Th1)
- Linfociti T citotossici CD8 + (CTL)
- Macrofagi M1
- Neutrofilo N1
- Cellule dendritiche (DC)

L'altra categoria comprende quelle cellule del sistema immunitario che, invece, contrastano la risposta antitumorale, favorendo quindi la crescita neoplastica, quali<sup>144</sup>:

- Macrofagi M2,



- Neutrofilii N2
- Linfociti T regolatori (Treg)
- Cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC)

### Linfociti

L'impatto prognostico dei linfociti intratumorali nel carcinoma della mammella è strettamente associato alla tipologia di linfociti presenti. Un'alta densità di linfociti CD8+ citotossici (CTL) è associata a una OS significativamente più lunga indipendentemente dalle caratteristiche cliniche del tumore e a una migliore risposta alla terapia<sup>145,146</sup>.

Per quanto riguarda invece i CD4+ il loro ruolo prognostico è inferiore, e questo è dovuto alla loro eterogeneità e al fatto che a seconda della tipologia di CD4+ possiamo avere funzioni opposte. Esistono almeno quattro linee cellulari diverse con funzioni opposte; Th1, Th2, Th17 e FOXP3+ Tregs<sup>147-150</sup>.

Le cellule Th1 sono associate a una prognosi più favorevole e a esiti clinici migliori, con una migliore sopravvivenza libera da malattia<sup>151-153</sup>. Le cellule Th1 rappresentano la fonte più importante di interferone- $\gamma$ .

Le cellule Th2 sono invece associate a una riduzione della risposta antitumorale<sup>154</sup>. È stato infatti dimostrato che le cellule Th2 promuovono l'evasione del tumore dalla sorveglianza immunitaria e che favoriscano un ambiente tumorale di Tipo II, che promuove lo sviluppo del carcinoma della mammella<sup>155,156</sup>.

Le cellule Th17, deputate alla produzione delle interleuchine 17 (citochine proinfiammatorie) sono associate a una prognosi sfavorevole<sup>151,152</sup>, sebbene il loro ruolo possa variare in base all'ambiente citochinico circostante<sup>157</sup>. La plasticità delle cellule Th17 è tale che in alcuni casi hanno mostrato un'efficace attività antitumorale<sup>158,159</sup>.

Esiste un sottogruppo CD4+, le cellule Th follicolari (Tfh), che è stato associato, qualora infiltrino il tumore, a un miglior outcome. In particolare il ruolo antitumorale dei Tfh intratumorali è associato alla produzione di CXCL-13, che ha ruoli importanti nel reclutamento immunitario<sup>151</sup>.

Le cellule Treg promuovono la progressione neoplastica (nel carcinoma della mammella e in altre neoplasie) con una serie di differenti meccanismi<sup>151,160,161</sup>. La presenza di Treg intratumorali nel carcinoma alla mammella è associata a una maggiore aggressività tumorale<sup>162-166</sup>. In particolare, tra i Treg, si associano a una prognosi sfavorevole nel

carcinoma della mammella i Treg FOXP3+, la cui densità intratumorale è legata a una diminuzione della OS. I Treg sono anche dei marker predittivi, in particolare il rapporto tra CD8+ e Treg influenza la risposta alla terapia neoadiuvante nel carcinoma alla mammella<sup>162,163,167-169</sup>.

Le cellule B invece hanno un ruolo ambiguo e controverso<sup>170,171</sup>, possono risultare fattori prognostici positivi o negativi. Vengono riscontrate soprattutto alla periferia del tumore e nelle strutture linfoidi terziarie<sup>171</sup>. Esse possono ad esempio indurre una risposta Th1, possono indurre la morte diretta delle cellule tumorali ma possono anche indurre una risposta Treg. Nel tipo di risposta B, e nel derivante ruolo prognostico, le cellule B sono stimulate verso un tipo di risposta dal microambiente tumorale<sup>172</sup>.

Le cellule NK possono uccidere le cellule tumorali direttamente, ma possono anche indurre altri tipi di risposte immunitarie. Nel carcinoma della mammella le cellule NK infiltranti il tumore (TINK) possono avere un ruolo predittivo e prognostico che cambia in base alla tipologia di TINK, al livello di attivazione delle stesse e al profilo molecolare del tumore<sup>173,174</sup>. In particolare, nel carcinoma Triple negative della mammella, la contemporanea presenza di NK e DC è correlata a un miglior outcome<sup>174</sup>.

Va sottolineato come il riscontro di un grado più o meno alto di linfociti intratumorali nelle sezioni in ematossilina-eosina (quindi senza uno studio immunohistochimico approfondito della tipologia di linfociti) nei carcinomi Her2+ e Triple negative, abbia un valore predittivo e prognostico favorevole<sup>175-178</sup>. Per dare una spiegazione a questo fenomeno bisogna considerare che i processi di regolazione negativa del sistema immunitario fanno parte di un fisiologico meccanismo di regolazione a feedback. La presenza di una forte regolazione può quindi indicare una maggiore immunogenicità del tumore a cui il sistema immunitario reagisce con una risposta attiva che viene poi regolata<sup>179</sup>. Di conseguenza, la presenza di una risposta immunitaria organizzata nel sito del tumore è segno di un sistema immunitario attivo (sebbene talora inefficace in senso antitumorale). Ciò può tradursi nella capacità del sistema immunitario di sviluppare una memoria immunologica che difende dalla malattia residua. Ci sono studi che dimostrano come la presenza di un infiltrato immunitario di grossa entità si associa a una migliore risposta al trattamento neoadiuvante e che risulta fattore prognostico positivo di controllo della malattia a lungo termine<sup>176-178</sup>.

### Cellule dendritiche (DC)

Le DC sono fondamentali per innescare la risposta immunitaria antitumorale, tramite la presentazione degli antigeni ai linfociti CD4+ e CD8+. Per potere svolgere questa loro funzione e innescare una risposta CD8+ le DC devono essere mature, e al processo di maturazione partecipa il TME. Il TME si è visto essere in grado di limitare la maturazione delle DC le quali, in questo stadio immaturo, stimoleranno una risposta Treg tramite la produzione di TGF- $\beta$  e IL-10<sup>180</sup>. In generale una presenza elevata di DC intratumorali è associata a un miglior percorso clinico del tumore<sup>181</sup>. È molto importante identificare i mediatori con cui le DC svolgono il loro ruolo, due mediatori di grande rilevanza sono IL-12 e TIM-3, entrambi prodotti da DC CD103+<sup>182,183</sup>.

### Macrofagi associati al tumore (TAM)

I TAM sono una popolazione molto rappresentata nel TME. Essi possono evolvere in due fenotipi differenti; M1 (antitumorali) ed M2 (protumorigenici), e lo switch verso uno dei due fenotipi è regolato, oltre che dal TME, dai linfociti T<sup>184</sup>. I TAM vengono reclutati tramite chemochine prodotte dallo stroma e dalle cellule neoplastiche maligne. Nel TME la popolazione più rappresentata è la M2, ovvero il fenotipo che contribuisce alla progressione e alla sopravvivenza tumorale tramite la produzione di chemochine e citochine (VEGF, IL-10 e TGF- $\beta$ )<sup>185,186</sup> e che richiama nel TME i Treg, i quali sopprimeranno la risposta citotossica antitumorale<sup>185</sup>. Nel carcinoma della mammella alcuni studi hanno associata un'alta densità di TAM a una prognosi più sfavorevole<sup>187,188</sup>. Tutte queste considerazioni aprono la strada a nuove possibili terapie che abbiamo come target i TAM.

Va evidenziato come i linfociti T che migrano e infiltrano il tumore possono essere attivati o soppressi dall'azione dei TAM M2, a sua volta la polarizzazione dei TAM verso uno dei due fenotipi è regolata dai linfociti T. Appare pertanto evidente l'importanza del cross-talk tra TAM e TILs<sup>164,189</sup>.

### Cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC)

Le MDSC sono una popolazione di origine mieloide che si espande durante il cancro (anche durante l'infiammazione e l'infezione) infiltrando la neoplasia, e possiede la capacità di sopprimere i linfociti T. Nel carcinoma della mammella le MDSC sono

responsabili della soppressione della risposta antitumorale, promuovendo l'evasione immunitaria del tumore, l'angiogenesi e la metastatizzazione<sup>190,192</sup>.

Similmente ai macrofagi M2 producono TGF- $\beta$  e IL-10, ma anche (distinguendosi in questo dai TAM) arginasi, ROS e ossido nitrico, tutti prodotti che inibiscono l'azione antitumorale e favoriscono la progressione tumorale<sup>190,193-195</sup>. Le MDSC si suddividono in due sottogruppi:

- MDSC granulocitiche (G-MDSC o PMN-MDSC) con fenotipo CD11b + Ly6G + Ly6Clow

- MDSC monocitiche (M-MDSC) con fenotipo CD11b +/Ly6G -/Ly6Chigh<sup>195,196</sup>.

Le M-MDSC solitamente esprimono arginasi ed NO, ma non producono livelli elevati di ROS, mentre le G-MDSC producono elevati livelli di ROS<sup>195</sup>.

Le MDSC si accumulano in sede intratumorale perché richiamate da una serie di chemochine (CCL1, CCL2, CCL5 e CXCL5). Una volta in sede esse interagiscono con le cellule tumorali in un cross-talk che porta alla produzione, da parte delle MDSC, di una serie di citochine e fattori di soppressione (enzima IDO, metalloproteinasi, IL 6, IL-6R $\alpha$ ) che promuovono l'invasione e la metastatizzazione del carcinoma della mammella<sup>195,197-201</sup>.

Una caratteristica peculiare delle M-MDSC è invece quella di potersi differenziare in vitro in DC o Macrofagi, caratteristica assente nelle G-MDSC<sup>196</sup>. Queste ultime hanno molti aspetti morfologici e fenotipici diversi.

Per quanto riguarda G-MDSC, posseggono molte caratteristiche morfologiche e fenotipiche in comune con i neutrofili, tanto da poter essere considerati come uno stato funzionale dei neutrofili stessi<sup>202</sup>. Una caratteristica peculiare delle M-MDSC è invece quella di potersi differenziare in vitro in DC o Macrofagi, caratteristica assente nelle G-MDSC<sup>196</sup> (90). Queste ultime hanno molti aspetti morfologici e fenotipici diversi. I numerosi meccanismi con cui le MDSC sopprimono la risposta immunitaria T sembrano essere target molto promettenti per future terapie<sup>197,203</sup>.

### Neutrofili associati al tumore (TAN)

È stato visto come le G-MDSC, assimilabili ai neutrofili per caratteristiche morfologiche e fenotipiche, abbiamo un ruolo immunosoppressivo e protumorale. I neutrofili TAN, invece, si dividono in due popolazioni con ruoli opposti. I TAN N1 hanno capacità di

distruggere le cellule tumorali e possiedono proprietà proinfiammatorie, risultando quindi antitumorali, invece i TAN N2 hanno capacità immunosoppressive e antinfiammatorie, risultando quindi pro-tumorigenici<sup>204,205</sup>.

Un recente studio ha dimostrato come l'infiltrazione, nel carcinoma della mammella, di TAN MPO+ è un marker prognostico indipendente di una migliore OS<sup>206</sup>.

### Fibroblasti

I fibroblasti associati al tumore (CAF) sono una popolazione molto rappresentata nel microambiente tumorale e posseggono uno spiccato ruolo protumorale. Questo ruolo protumorale si esplica mediante la secrezione di numerosi prodotti, in particolare all'interno dei carcinomi della mammella invasivi i CAF ne promuovono la crescita grazie alla secrezione di SDF-1 (fattore 1 derivato dalle cellule stromali). SDF-1 agisce in due modi:

- promuove il reclutamento di cellule endoteliali progenitrici circolanti e la conseguente angiogenesi
- stimola il recettore CXCR4, presente sulle cellule tumorali, stimolando direttamente la moltiplicazione cellulare<sup>207</sup>.

I CAF possono derivare dai fibroblasti (tramite modificazioni epigenetiche), da cellule staminali mesenchimali del midollo osseo, da cellule epiteliali (transizione epiteliale-mesenchimale o EMT), da cellule endoteliali (transizione endoteliale-mesenchimale o EndMT) o da adipociti peritumorali<sup>208</sup>.

Un sottogruppo di questi progenitori, dopo essere stato reclutato dalla neoplasia e dal microambiente tumorale, acquisisce lo status CAF1. Le modificazioni che portano al fenotipo CAF non sono modificazioni genetiche come mutazioni a carico di oncosoppressori e/o oncogeni, tipiche invece delle cellule neoplastiche, quanto piuttosto modificazioni epigenetiche, cambiamenti nell'espressione di RNA non codificanti e l'attivazione di assi di trasduzione del segnale<sup>209-214</sup>.

È da segnalare il fatto che esistono anche dei CAF associati al carcinoma della mammella la cui presenza si associa a una prognosi più favorevole ed a una OS migliore, questo è il caso dei CAF che esprimono la caveolina-1<sup>215</sup>.

### Strutture linfoidi terziarie (TLS)

Le sono delle strutture linfoidi che si formano alla periferia del tumore e che somigliano, per morfologia e genesi, alle strutture linfoidi secondarie.

La protratta stimolazione antigenica da parte di linfociti e cellule stromali porta alla produzione di CXCL13 e IL-7, le quali recluteranno le cellule LTi (induttore del tessuto linfoide)<sup>216</sup>. Le cellule LTi interagiscono quindi con le cellule stromali tramite il legame LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 (linfotossina  $\alpha$ 1 $\beta$ 2)<sup>1</sup> e il suo recettore LT $\beta$ R<sup>217</sup>. L'azione combinata della via di segnalazione di LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 e dell'IL-17 (secreta dalle LTi) porta alla secrezione di alcune chemochine (CXCL12, CXCL13, CCL19 e CCL21) che permetteranno il reclutamento linfocitario e l'organizzazione anatomico/funzionale delle TLS con le distinte zone B e T<sup>218,219</sup>. Nel carcinoma della mammella un'alta densità di TLS è associata a una prognosi migliore<sup>151,220</sup>.

Un'alta densità di TLS, infatti, si associa a una maggiore attivazione di geni caratteristici dell'attivazione T, dello switch verso il fenotipo Th1, di una maggiore citotossicità T e della chemiotassi. Si riscontra inoltre un maggior numero di cellule T della memoria<sup>151,220-222</sup>.

## 1.4 Immunoscore

Il classico sistema TNM di stadiazione delle neoplasie riassume le caratteristiche sull'estensione tumorale (T), la presenza di cellule neoplastiche nei linfonodi loco-regionali (N) e l'evidenza di metastasi a distanza (M). Tuttavia, è ben noto che, a parità di stadio TNM, neoplasie simili sotto molteplici aspetti morfologici abbiano *outcome* molto differenti. Per tali ragioni, nelle edizioni più recenti del sistema di stadiazione vengono aggiunti ulteriori descrittori al fine di ottenere un quadro prognosticamente più attendibile. E, allo stesso modo, la ricerca scientifica degli ultimi decenni si è concentrata sullo studio di nuovi aspetti che possano fornire un quadro sempre più completo sul comportamento biologico delle neoplasie, portando all'introduzione di classificazioni stratificate in relazione alle cellule di origine, ai pathway molecolari, allo status mutazionale o al profilo di espressione genica.

Il limite di tutti questi approcci classificativi è dato da una prospettiva incentrata unicamente sulla cellula neoplastica, che viene spesso completamente decontestualizzata dal macro- e microambiente in cui la neoplasia stessa insorge e si sviluppa.

In questo contesto si inseriscono le ricerche finalizzate all'approfondimento delle conoscenze sul microambiente tumorale e, ancora più recentemente, sul contesto immunologico neoplastico.

In letteratura sono presenti diversi studi che dimostrano come la risposta immune dell'ospite in situ contro le cellule neoplastiche possa avere un impatto, anche notevole, sulla prognosi.

La metodica dell'immunoscore è stata messa a punto per quantificare l'infiltrato immunitario neoplastico e ottenere delle informazioni prognostiche, con valore predittivo addirittura superiore ai tradizionali sistemi di staging<sup>8</sup>.

Le neoplasie a comportamento biologico benigno e maligno spesso si caratterizzano per la presenza di cellule immunitarie. Diversi esperimenti condotti su topi con immunodeficit hanno evidenziato un ruolo dell'immunità adattiva nell'immunosorveglianza anti-tumorale<sup>223-226</sup>. Le cellule neoplastiche, infatti esprimono numerosi antigeni che costituiscono il bersaglio di una risposta immunitaria adattiva T-mediata<sup>227,228</sup>. La differenziazione dei linfociti T CD4+ naive in cellule Th1, produttori interferon- $\gamma$ , promuove una risposta immunitaria mediata da linfociti T CD8+<sup>229</sup> 110.

Sperimentalmente, nei topi, le cellule del sistema immunitario sembrano prevenire lo sviluppo dei tumori e sembrano inibire la progressione tumorale<sup>223,225,226</sup>.

L'immunità anti-tumorale può determinare anche un fenomeno di immunoediting, processo che favorisce l'espansione di cellule neoplastiche con immunogenicità ridotta<sup>225</sup>.

Il ruolo del sistema immunitario nelle neoplasie umane è ancora poco chiaro<sup>230</sup>.

È noto che le cellule del sistema immunitario possono rilasciare mediatori infiammatori con effetti pro-angiogenetici e pro-metastatici<sup>231-236</sup>.

Inoltre, i linfociti infiltranti il tumore (TIL) nel melanoma, nel carcinoma del colon-retto e nei tumori ovarici sembrerebbero inibire la crescita tumorale e sono associati a una prognosi migliore<sup>237-241</sup>. Dopo la stimolazione antigenica da parte delle cellule neoplastiche, una piccola popolazione di linfociti T della memoria residua nel tessuto<sup>242</sup>. A tal riguardo, Galon et al hanno dimostrato che nei carcinomi del colon-retto umani caratterizzati da un'alta densità di cellule della memoria e cellule T effettrici della memoria si osserva una minore tendenza alla disseminazione linfo-vascolare, all'infiltrazione delle strutture perineurali e ai linfonodi<sup>243</sup>.

Su tali basi, il gruppo di Galon ha condotto, a partire dal decennio scorso, numerosi studi sul carcinoma colon-rettale finalizzati all'individuazione di un "tool prognostico" basato essenzialmente sulla densità dell'infiltrato linfoide CD3+ e CD8+ nelle diverse aree tumorali, proponendo, in questo modo, un sistema di scoring in 5 categorie, che individuerrebbe classi prognostiche indipendenti dalle caratteristiche morfologiche e dallo stadio ottenuto con il sistema TNM<sup>8,142</sup>.

In particolare, per la determinazione dell'immunoscore vengono considerate la densità di cellule CD3+ e CD8+, nella porzione centrale (TC) e nella porzione periferica (IM) della neoplasia. In termini prognostici la popolazione linfocitaria la cui densità fornirebbe una stima più accurata è rappresentata dai linfociti con fenotipo CD3+ CD8+ CD45RO+ Granzyme B+. Di questi quattro marker vengono scelti CD3 e CD8 poiché la loro misurazione tramite immunisto chimica risulta essere la più affidabile e la più facilmente riproducibile nella pratica routinaria<sup>8,142</sup>.

Viene fornito un punteggio che varia da i0 (bassa densità di infiltrato linfocitario in entrambe le regioni) a i4 (alta densità di infiltrato linfocitario in entrambe le regioni)<sup>244</sup>.



Si assegna un punto ogni volta che in una regione (TC o IM) viene superato uno specifico cut-off per un determinato marker (CD3 o CD8).

## 1.5 Valutazione dei linfociti infiltranti il tumore (TILs)

I linfociti infiltranti il tumore (TILs) rappresentano linfociti migrati dal sangue periferico al tumore, essi contribuiscono al microambiente tumorale. È stato dimostrato che i TILs forniscono un valore prognostico e potenzialmente predittivo, in particolare nei carcinomi mammari HER2-enriched e nei triplo-negativi.

La valutazione morfologica viene effettuata nelle sezioni routinariamente colorate in ematossilina ed eosina (H&E).

È necessaria una metodologia standardizzata per la valutazione dei TILs come prerequisito per l'integrazione di questo parametro nella pratica istopatologica standard<sup>245</sup>; a tal proposito l'International TILs Working Group nel 2014 ha riconosciuto la necessità di fornire delle raccomandazioni utili per una valutazione standardizzata dei TIL, garantendone l'integrazione in futuri studi clinici, la sua applicazione nella ricerca e nella pratica diagnostica di routine<sup>245,246</sup>.

### TILs stromali e intratumorali

I primi studi sui TILs nel carcinoma mammario valutavano separatamente i linfociti stromali e intratumorali. I TILs intratumorali sono identificati come linfociti presenti nelle aree tumorali che interagiscono direttamente con le cellule neoplastiche senza interposizione di stroma, mentre i TILs stromali si trovano dispersi nello stroma neoplastico e non prendono direttamente contatto con le cellule tumorali. Dal momento che entrambe le tipologie sono localizzate nel tessuto tumorale, è necessario sottolineare che le due categorie rappresentano TILs reali. Inoltre, poiché i TILs sono in grado di muoversi all'interno di un microambiente tissutale dinamico, la distinzione può essere in qualche modo artificiosa e correlata alla staticità dei preparati istologici usati per la valutazione diagnostica<sup>245</sup>.

Secondo l'ipotesi originale, i linfociti direttamente a contatto con le cellule neoplastiche rappresenterebbero gli elementi immunitari più rilevanti e quindi più utili per la valutazione diagnostica. Recenti evidenze indicano come, nella terapia neoadiuvante per il carcinoma triplo-negativo, la componente sia stromale che intratumorale abbiano valore predittivo della risposta alla chemioterapia a base di platino<sup>247</sup>. Tuttavia, soprattutto per

finalità pratiche, la maggior parte degli studi attuali ha evidenziato che la valutazione dei TILs stromali rappresenterebbe un parametro più agevolmente riproducibile; ciò perché i TILs intratumorali sono generalmente presenti in numero inferiore, mostrano una distribuzione più eterogenea e pertanto più difficili da valutare su vetrini nella diagnostica routinaria, soprattutto senza l'uso di metodiche ancillari quali, l'immunoistochimica o l'immunofluorescenza<sup>245</sup>.

Per l'International TILs Working Group, la raccomandazione attuale è quella di valutare la componente stromale. Ulteriori parametri, tra cui i TILs nella regione peritumorale, i TILs nei margini invasivi e i TILs intratumorali possono ancora essere inclusi a fini di ricerca per determinare ulteriormente e/o confermare la loro potenziale rilevanza clinica. Nella maggior parte degli studi pubblicati è stata utilizzata la metodica da Denkert et al. nel 2010<sup>245</sup>, fornendo così dati sufficienti nella fase iniziale per lo sviluppo di una metodologia uniforme<sup>248</sup>.

I TILs stromali dovrebbero essere valutati in percentuale. Nei tumori eterogenei, è necessario valutare le diverse regioni e riportare la media.

I TILs valutati con questa metodica hanno dimostrato di aggiungere informazioni prevalentemente prognostiche ma, rimane aperta la questione sulla loro valutazione morfologica. La valutazione su sezioni colorate con ematossilina/eosina rappresenta molto probabilmente un punto di inizio, sebbene l'enorme complessità dei linfociti suggerisca che la caratterizzazione molecolare dell'infiltrato possa aggiungere sia sensibilità che specificità al valore predittivo dei TILs<sup>245,249,250</sup>.

Per la determinazione percentuale dei TILs devono essere identificati i confini del tumore invasivo in modo da poter valutare solo i TILs presenti nella massa neoplastica. Non devono essere considerate le aree con artefatti, necrosi e infiammazione intorno ai siti biotici o le zone centrale di regressione ialina. Una biopsia necrotica è considerata non classificabile. Gli infiltrati infiammatori possono essere osservati ad una certa distanza dal letto tumorale del nodulo principale e anche nei lobuli normali adiacenti ma questi infiltrati non dovrebbero essere inclusi nella valutazione standardizzata dei TILs stromali. Nelle aree circostanti il tumore è possibile osservare aggregati follicolari e TILs con centri germinativi indicativi di una risposta immunitaria attiva, anche questi aggregati non dovrebbero essere inclusi nella valutazione dei TILs stromali; è possibile registrare questi

parametri separatamente a fini di ricerca in quanto rappresentano aree di attivazione delle cellule T e B<sup>151, 245,249,251</sup>.

Attualmente, l'Organizzazione Mondiale della Sanità, nella V edizione della classificazione dei tumori della mammella, suggerisce la valutazione dei TILs stromali, sebbene ancora non rappresenti un parametro obbligatorio da riportare nel referto anatomico-patologico<sup>252</sup>.

## **1.6 Approcci immunoterapici nei carcinomi triplo-negativi della mammella**

I carcinomi triplo-negativi della mammella mostrano non poche problematiche sul piano delle possibilità terapeutiche, essendo queste ultime, attualmente, limitate alla sola chemioterapia tradizionale, a causa della mancanza di target molecolari per questo sottogruppo di pazienti. Infatti, la negatività per i recettori estro-progestinici e l'assenza di amplificazione di Her2 precludono l'impiego di trattamenti anti-ormonali e del Trastuzumab, rispettivamente.

In letteratura sono riportate diverse evidenze che dimostrano come l'outcome clinico di alcuni TNBC possa essere condizionato dalla presenza di cellule immunitarie infiltranti il tumore.

Pertanto, tali forme caratterizzate dalla presenza di una reazione immunologica associata, sin dalla prima diagnosi e non legata ad eventuale trattamento, potrebbero trarre beneficio da terapie immune-based, ancora meglio se associate a farmaci citotossici in grado di potenziare l'immunità adattiva anti-tumorale.

Recentemente, sono stati prodotti dati che rivelano l'importanza dei linfociti infiltranti il tumore (TILs) nel controllo della progressione di diverse neoplasie epiteliali maligne, come nei carcinomi del colon-retto, dove la valutazione di linfociti CD8+ intratumorali sembrerebbe avere un valore prognostico addirittura superiore al sistema tradizionale di stadiazione TNM<sup>253,254</sup>.

Nei carcinomi della mammella sono riportati dati su alcune serie di casi, che supporterebbero una correlazione tra immune gene signature e un migliore outcome clinico<sup>255,256</sup>. Studi sullo stroma associato al tumore hanno rivelato un profilo di espressione genica associato a una prognosi particolarmente favorevole, caratterizzato da un'elevata densità di linfociti CD8+ e cellule natural killer<sup>257</sup>.

Mentre gli infiltrati linfoidi CD8+ sarebbero associati a una prognosi migliore, la presenza di un infiltrato prevalentemente costituito da linfociti CD4+, compresi i linfociti T-reg, o da macrofagi associati al tumore (TAMs) si assocerebbe ad una prognosi scarsa. I linfociti CD8+ sarebbero in grado di indirizzare una risposta in senso antineoplastico, ma la presenza di linfociti CD4+, T-reg e macrofagi annullerebbe tale effetto<sup>258</sup>.

La conoscenza delle caratteristiche intrinseche dei TNBC può aiutare a spiegare meglio la tendenza di queste neoplasie ad evocare una risposta infiammatoria. Ad esempio, la down-regolazione dei recettori ormonali e di HER2 determina effetti pro-infiammatori. È dimostrato, inoltre, che l'efficacia di alcuni chemioterapici antineoplastici, come le antracicline, si espliciti non solo attraverso un effetto citotossico diretto, ma anche attraverso un effetto immuno-mediato<sup>259</sup>. West et al hanno riportato che la presenza di un'elevata espressione di geni linfocitari sia associata a un alto tasso di risposta alla chemioterapia neoadiuvante con antracicline<sup>260</sup>.

L'effetto immuno-stimolante delle antracicline prevede un processo a tre fasi: (1) la traslocazione pre-apoptotica della calreticulina sulla superficie della cellula tumorale; (2) il rilascio post-apoptotico di HMGB1; (3) il rilascio extracellulare di ATP. Calreticulina, HMGB1 e ATP agiscono, poi, promuovendo la presentazione degli antigeni tumorali da parte delle cellule dendritiche, attraverso l'attivazione di CD91, del recettore Toll-like 4 e dei recettori purinergici P2X7, rispettivamente. L'autofagia indotta dalla chemioterapia è essenziale per il rilascio di ATP e, quindi, per l'attivazione dei meccanismi di immunità anti-tumorale. Ne consegue che i TNBC caratterizzati da difetti di autofagia potrebbero trarre beneficio da strategie terapeutiche in grado di compensare tale processo<sup>261</sup>.

Le alterazioni genetiche ed epigenetiche nei TNBC portano alla formazione di numerosi antigeni tumore-associati, teoricamente utilizzabili dal sistema immunitario per distinguere le cellule neoplastiche da quelle normali<sup>262,263</sup>.

### **1.6.1 Check-point immunologici**

Nell'uomo, l'immunità antitumorale è spesso difettiva a causa di rigidi meccanismi di regolazione finalizzati al mantenimento dell'omeostasi immunologica. Tra questi uno dei più conosciuti è il fenomeno di "esaurimento, o esaustione, delle cellule T", dovuto alla stimolazione antigenica cronica e caratterizzato da una up-regolazione dei recettori ad azione inibitoria. Tali recettori funzionano come punti di controllo con lo scopo di limitare risposte immunitarie incontrollate.

Il blocco di questi checkpoint immunologici con anticorpi monoclonali determina il recupero funzionale di linfociti T altrimenti esausti e, soprattutto, esita in risposte clinicamente rilevanti nei pazienti neoplastici.

Programmed cell death protein-1 (PD-1) è un immunorecettore con attività inibitoria responsabile dell'attivazione delle cellule T. Gli studi effettuati sui modelli murini hanno chiarito il ruolo inibitorio sulla risposta immune del recettore PD-1 e dei suoi ligandi PD-L1 e PD-L2<sup>264</sup>.

L'attivazione delle cellule T e la creazione di un'immunità protettiva efficace è il risultato di un delicato equilibrio tra segnali negativi e positivi: i segnali negativi, oggetto di questo studio, inibiscono l'attivazione delle cellule T o ne inducono l'apoptosi attraverso molecole di superficie come CTLA-4, CD95, CD5, CD31. In assenza di un controllo appropriato, l'attivazione delle cellule T può portare alla compromissione della tolleranza-self e dunque a patologia autoimmune: i modelli privati di entrambe le copie del gene codificante per PD-1 (PD1<sup>-/-</sup>) sviluppano patologie linfoproliferative-autoimmuni (lupus-like disease e artrite), fino allo sviluppo di patologia cardiaca grave che ne determina la morte.

PD-1 è espresso sulle cellule T attivate, sulle cellule B e sui monociti e lega le molecole PD-L1 e 2, entrambe membri della famiglia proteica B7, espresse costitutivamente nel cuore, nei polmoni, nei reni, nel fegato, nella milza e in alcune cellule del sistema immunitario. L'effetto di tale legame si esplica nell'inibizione della proliferazione linfocitaria come risultato della mancata produzione dell'IL-2: le cellule T CD4<sup>+</sup> tuttavia, possono essere attivate attraverso altri pattern co-stimolatori endogeni al contrario delle cellule CD8<sup>+</sup> che rimangono inattive<sup>265</sup>.

Chiariti gli aspetti fondamentali del ruolo del legame PD1:PD-L risulta semplice comprendere come tali molecole siano direttamente implicate nello sviluppo, da parte delle cellule tumorali, di una significativa resistenza contro l'attività antitumorale svolta dalle cellule immunitarie: qualora la cellula tumorale dovesse sviluppare la possibilità di attivare costitutivamente l'inibizione delle cellule immunitarie sfruttando il sistema del recettore PD e dei suoi ligandi, garantirebbe per sé un potente meccanismo di immuno-escape.

Tra i più promettenti approcci all'inibizione terapeutica di tale resistenza vi è il blocco di specifici checkpoints immunologici<sup>266-270</sup>. Come chiarito dagli studi di Drew M. Pardoll nell'articolo "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy" pubblicato nel 2012 sulla rivista Nature, è ormai certo che le cellule tumorali sfruttino i pathways del checkpoint immunologico come principale meccanismo di immunoresistenza, soprattutto contro le cellule T che sono specifiche per gli antigeni tumorali. Dato che la maggior parte dei checkpoints immuni sono iniziati da interazioni ligando-recettore, essi possono essere inibiti tramite anticorpi o modulati tramite ligandi ricombinanti. A tal proposito è necessario menzionare lo studio di James P. Allison e Tasuku Honjo che è valso loro il premio Nobel per la Medicina nel 2018 "for their discovery of cancer therapy by inhibition of negative immune regulation": hanno studiato i pathways che coinvolgono CTLA4 e PD1 e hanno rivelato che i suddetti, chiamati "brakes" (freni), sono indubbiamente quelli che, se inibiti, consentono la più efficace eradicazione delle cellule tumorali. L'idea di potenziare il sistema immune del paziente, piuttosto che deprimere in toto l'attività mitotica di tutti i tessuti, neoplastici e non, o le principali vie metaboliche di cellule sane o tumorali, è non più pionieristica ma reale: le molecole che recentemente si sono inserite a grande merito nella famiglia dell'immunoterapia sono gli anticorpi monoclonali anti PD-1 (Nivolumab e Pembrolizumab), anti CTLA-4 (Ipilimumab) e anti PD-L1 (Atezolizumab), i quali hanno mostrato efficacia nei tumori Polmonari al IV Stadio TNM, nei tumori renali a progressione lenta e nel melanoma metastatico non BRAF-mutato<sup>271-273</sup>.

Gli anticorpi monoclonali antiPD-1 (nivolumab; pembrolizumab) bloccano l'interazione tra PD-1 e i recettori PD-L1 e PD-L2; gli anticorpi monoclonali antiPD-L1 bloccano l'interazione PD-L1/PD-1 e PD-L1/CD80.

Nell'ambito della patologia neoplastica della mammella, come si è detto, non mancano di certo le strategie terapeutiche efficaci per i sottotipi molecolari esprimenti recettori ormonali o amplificazioni del gene HER2 ma non è possibile dire lo stesso per i TNBCs, che ad oggi hanno la prognosi peggiore tra tutti i sottotipi in termini di Local Control Rate (89,6%), Overall Survival (78,5%) e Relative Overall Survival (80,1%)<sup>274</sup>, sia a causa della natura biologica estremamente aggressiva del sottotipo in questione, sia per la mancanza di terapie efficaci come per gli altri sottotipi, come la terapia ormonale e il



Trastuzumab. Per questo motivo è necessario approfondire la possibilità di impiegare l'immunoterapia sui TNBCs esprimenti PD-L1.

Come detto precedentemente, PD-L1 (anche noto come CD274 e B7-H1) è uno dei due ligandi del recettore PD1 che media la risposta e la soppressione del sistema immune antitumorale; è una glicoproteina trans-membrana costituita da un piccolo dominio citoplasmatico, un dominio di membrana e uno extracellulare legante il recettore<sup>275,276</sup>. La sua espressione è stata osservata nei normali macrofagi tissutali ma viene up-regolata anche nelle cellule presentanti l'antigene, nelle cellule B e T, nelle cellule epiteliali, muscolari, endoteliali<sup>277</sup> e nelle linee cellulari maligne di un discreto numero di tumori come il melanoma, i tumori polmonari, mammari, colo-rettali e pancreatici<sup>278-283</sup>.

L'acquisizione di sempre più approfondite conoscenze nell'ambito della risposta immune antitumorale ha aperto nuove prospettive terapeutiche nei confronti di neoplasie altamente maligne con prognosi infausta e, ad oggi, aggredibili solo con terapia chemioterapica aspecifica: nella pratica di routine, l'analisi immunohistochimica dell'espressione di PD-L1 potrebbe risultare essenziale per giudicare un paziente idoneo alla somministrazione dell'immunoterapia agente sul pathway in questione. Data la presenza in commercio di numerose varianti del clone PD-L1, risulta indispensabile per la diagnostica patologica trovare il clone più affidabile nell'individuazione della positività allo stesso, la quale può variare in uno stesso campione in base al clone utilizzato<sup>284</sup>. [67] I cloni di anticorpi monoclonali di PD-L1 attualmente disponibili in commercio sono molteplici; lo studio di Woo Young Sun e collaboratori ha analizzato i cloni E1L3N, 28.8 e SP142 testandoli su carcinomi mammari triplo-negativi: tra tutti il clone E1L3N ha mostrato il più alto rate di espressione sia nelle cellule tumorali che nelle cellule immuni (controllo positivo), SP142 quello più basso, mentre il clone 28.8 rappresenta invece una via di mezzo<sup>285</sup>. La ricerca portata avanti da Tejashree Karnik e collaboratori ha invece confrontato gli anticorpi SP263, 22C3 (impiegato in questo studio) e RbMCAL10 i quali hanno fornito, tutti e tre, buoni risultati: l'alta concordanza è stata garantita dal fatto che l'85% circa dei campioni era negativo (0% cellule positive) allo stesso modo nei tre diversi cloni<sup>286</sup>. Nella valutazione di positività di PD-L1 non deve inoltre essere trascurata la sua localizzazione di espressione nel quadro tumorale: a differenza di quanto si è visto per i tumori polmonari e i melanomi, la positività di PD-L1 di un carcinoma mammario

deve essere valutata anche nell'infiltrato infiammatorio che, se presente, è costituito prevalentemente da cellule CD68+ e CD3+ (CD8>CD4)<sup>287</sup>.

Lo studio in fase diagnostica di PD-L1 non è una valutazione di positività fine a sé stessa ma serve da supporto per la scelta di quale terapia è la più efficace in questo sottotipo molecolare.

Dal luglio del 2018 è disponibile in Italia Atezolizumab, la prima immunoterapia approvata da AIFA per il trattamento in monoterapia di pazienti adulti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) localmente avanzato o metastatico, precedentemente sottoposti a chemioterapia. L'elemento fondamentale che contraddistingue Atezolizumab è il suo meccanismo d'azione diretto, selettivo e completo, che rappresenta una novità in confronto agli anti PD-1 presenti sul mercato. Diretto in quanto mira precisamente alla proteina PD-L1 nelle cellule tumorali e nelle cellule immunitarie infiltranti il tumore per riattivare le cellule T; selettivo in quanto preserva le interazioni tra PD-L2 e PD-1, contribuendo a minimizzare le reazioni autoimmuni nel tessuto sano, aumentando la tollerabilità del farmaco e diminuendo gli effetti collaterali; completo in quanto impedisce alla proteina PD-L1 di legarsi alle altre proteine, come ad esempio il recettore B71 presente in alcuni tipi di linfociti, sia in ambiente tumorale che nel linfonodo.

Certamente incoraggianti sono i risultati terapeutici nei confronti dei tumori triplo-negativi di Atezolizumab, che infatti è stato approvato dalla FDA negli Stati Uniti , più recentemente in Italia dalla AIFA; come dimostrato dallo studio del gruppo di P. Schmid e S. Adams, condotto in doppio cieco su 451 pazienti con TNBC metastatico, i pazienti trattati con Atezolizumab più nab-paclitaxel hanno avuto una progression-free survival di 7,2 mesi, più lunga di 1,8 mesi rispetto ai pazienti trattati con placebo più nab-paclitaxel. La combinazione di Atezolizumab più nab-Paclitaxel è il primo regime immunoterapeutico ad essere approvato per i tumori della mammella, rappresentando un passo significativo nella lotta ai tumori mammari triplo-negativi.

Secondo le più recenti evidenze riportate in letteratura, una percentuale di linfociti PDL1+ intratumorali superiore all'1% rappresenta il cut-off sufficiente per l'indicazione alla terapia con Atezolizumab nelle pazienti con carcinoma triplo-negativo non resecabile localmente avanzato o metastatico e che non sono stati sottoposte a precedente chemioterapia per malattia metastatica; questa è inoltre l'indicazione ufficialmente

fornita dall'AIFA che in seguito della pubblicazione della Determina AIFA nella GU n. 188 del 28/07/2020, a partire dal 29/07/2020 ha approvato l'utilizzo, in regime di rimborsabilità SSN, del medicinale TECENTRIQ (Atezolizumab).

## 1.7 Il recettore androgenico nei carcinomi triplo-negativi

I carcinomi triplo-negativi rappresentano, come già detto, un sottotipo particolarmente eterogeneo di carcinoma mammario, sia a livello molecolare che a livello genetico<sup>288</sup>. Sono stati fatti numerosi tentativi di sottoclassificazione, in base a livelli di EGFR, IGF-1, proteina Numb, instabilità cromosomica, caratteristiche istopatologiche e storia riproduttiva delle pazienti<sup>289-299</sup>. La letteratura ha evidenziato la presenza di carcinomi triplo-negativi caratterizzati dall'espressione del recettore per gli androgeni (AR) e ciò ha portato ad approfondire lo studio delle vie del segnale regolare dagli androgeni al fine di individuare possibili terapie mirate. Ciononostante, il significato biologico di AR nei TNBC è ancora relativamente poco chiaro.

Il recettore per gli androgeni è un membro della famiglia dei recettori nucleari steroidei che includono anche i recettori per gli estrogeni e per il progesterone. Diversi sono i ligandi in grado di interagire con tale recettore, inclusi i ligandi endogeni DHT e T, nonché una varietà di agonisti e antagonisti sintetici<sup>300-302</sup>. I risultati degli studi riportati all'inizio degli anni '70 nelle linee cellulari e nei tessuti evidenziarono l'importanza dell'azione degli androgeni nel carcinoma mammario femminile<sup>303,304</sup>. Ulteriori studi hanno portato alla dimostrazione di una correlazione tra i pathways AR e ER/PgR-mediati, di un ruolo potenziale del pathway androgenico nella prognosi delle pazienti, nonché l'esistenza di una risposta proliferativa agli androgeni in un'ampia varietà di linee cellulari di carcinoma mammario AR+ e la presenza di una cascata di segnalazione intracellulare androgeno-dipendente in tumori della mammella AR+<sup>305-308</sup>.

L'AR è espresso fino al 100% dei tumori mammari, sebbene questo numero sia variabile nelle diverse casistiche riportate (50–100%)<sup>309-314</sup>. In gran parte dei carcinomi mammari, i livelli di espressione sarebbero addirittura più elevati rispetto ai livelli di espressione di ER o PgR. Pertanto, la manipolazione dei segnali mediati dal recettore androgenico nelle cellule di carcinoma mammario potrebbe esitare in risvolti terapeutici nelle pazienti con carcinoma mammario AR+, anche alla luce della disponibilità di agenti mirati nei confronti dell'AR, sviluppati principalmente per il trattamento del carcinoma prostatico. Alcuni studi avrebbero dimostrato come la positività del recettore androgenico possa definire un sottogruppo di pazienti con sopravvivenza favorevole. Tuttavia, altri studi clinici dimostrerebbero che la sopravvivenza delle pazienti con TNBC non avrebbe

alcuna correlazione con l'espressione di AR. Secondo un recente studio multi-istituzionale, infine, lo status di AR mostrerebbe pattern prognostici popolazione specifici in termini di overall survival<sup>315</sup>.

Infine, non possono essere trascurati i ruoli del microambiente stromale e la sua interazione endocrina o paracrina nel TNBC. L'impiego di agonisti o antagonisti degli androgeni potrebbe influire in modo rilevante sul tessuto stromale neoplastico e ulteriori studi potrebbero chiarire il ruolo dello stroma nel TNBC.

Il trattamento anti-androgenico nei TNBC, in particolare nel sottotipo molecolare LAR, è attualmente oggetto di studio. Il sottotipo LAR e in generale i carcinomi triplo-negativi AR+ si caratterizzano per una minore sensibilità alla chemioterapia e una più frequente presenza di metastasi ai linfonodi ascellari<sup>316</sup>. Tali forme potrebbero essere responsive al trattamento con farmaci ad azione antagonista verso il recettore androgenico, utilizzati per il trattamento del carcinoma prostatico, quali bicalutamide, enzalutamide e abiraterone acetato. I trials clinici finora condotti hanno dimostrato un variabile beneficio legato all'impiego di tali farmaci ad azione antiandrogenica nei TNBC, ma sono ancora necessarie ulteriori evidenze per consentirne l'impiego nella pratica clinica<sup>317-320</sup>.

## **2. OBIETTIVO DELLO STUDIO**

Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare le caratteristiche istomorfologiche e immunoistochimiche della reazione stromale neoplastica (fibrosi, proliferazione vascolare ematica e linfatica), dell'infiltrato linfocitario, nonché l'applicabilità dell'immunoscore in una casistica di carcinomi invasivi triplo-negativi della mammella, con un approfondimento dell'analisi volto alla ricerca di un'associazione con le caratteristiche prognostiche. Ulteriore finalità è stata quella di valutare l'espressione del recettore per androgeni nelle cellule neoplastiche.

Le caratteristiche studiate sono state valutate, con finalità comparative, anche in gruppi di controllo rappresentati da carcinomi invasivi non triplo-negativi (Luminali A, Luminali B Ki67+, Luminali B Her2+, Her2-enriched).

Lo studio della stromatogenesi, dei marcatori stromali/immunologici (in particolare PDGFR $\beta$  e PD-L1) e dell'espressione del recettore per androgeni è stato rivolto alla identificazione di potenziali bersagli terapeutici, già riportati dalla letteratura scientifica, che amplierebbero il limitato ventaglio di opzioni terapeutiche per tali neoplasie a prognosi spesso infausta, con la possibilità di introdurre nella pratica diagnostica istopatologica routinaria la valutazione di nuovi aspetti, da applicare nella pratica diagnostica routinaria, in grado di delineare con maggiore precisione le caratteristiche dei carcinomi triplo-negativi.

### 3. MATERIALI E METODI

È stato condotto uno studio retrospettivo su 48 campioni di quadrantectomia mammaria con diagnosi di carcinoma duttale invasivo NST triplo-negativo, fissati in formalina e inclusi in paraffina, ricavati dagli archivi della U.O. di Anatomia e Istologia Patologica dell'A.O.U. Policlinico "P.Giaccone" di Palermo.

Sono stati retrospettivamente selezionati 4 gruppi di controllo, ciascuno dei quali costituito da 48 carcinomi invasivi NST in modo da ottenere gruppi di confronto numericamente omogenei, classificati come Luminal A, Luminal B Ki67+, Luminal B Her2+, Her2-enriched.

La casistica studiata era pertanto costituita da 240 carcinomi mammari invasivi, tutti di istotipo non speciale (NST). Non sono state infatti incluse nella casistica forme speciali, in quanto caratterizzate da specifiche caratteristiche prognostiche e predittive

Tutti i casi in studio erano costituiti da carcinomi invasivi valutati in prima diagnosi e in assenza di trattamento neoadiuvante.

Per tutti i casi in studio, sono stati riesaminati i vetrini colorati con ematossilina-eosina per la determinazione dell'istotipo, in accordo con la più recente edizione della Classificazione dei tumori della mammella WHO<sup>252</sup> e del grading, applicando il sistema combinato di Nottingham<sup>321</sup>.

Sono state valutate: età della paziente, dimensioni del nodulo neoplastico, multifocalità, la presenza di necrosi, invasione vascolare, infiltrazione perineurale, carcinoma duttale in situ associato, metastasi linfonodali.

Sono state rivalutate le colorazioni immunohistochimiche per ER, PgR, HER2 e Ki67 per la conferma del sottotipo immunofenotipico.

Le valutazioni immunohistochimiche di ER, PgR, HER2 e Ki67 si sono basate sulle attuali linee guida, in particolare quelle proposte dall'ASCO/CAP e dalla WHO<sup>13,252,322</sup>.

ER e PgR sono stati considerati positivi in presenza di una colorazione nucleare in almeno l'1% delle cellule neoplastiche<sup>322</sup>.

La positività per HER2 è determinata dalla presenza di uno score immunohistochimico 3+, definito come positività di membrana, intensa e completa, in almeno il 10% della componente cellulare neoplastica, in accordo con le linee guida proposte dall'ASCO/CAP 2018<sup>13</sup>.

Su ciascun caso, indipendentemente dalla suddivisione in gruppi immunofenotipici, è stata effettuata una valutazione delle caratteristiche morfologiche dello stroma neoplastico, per la stratificazione della casistica complessiva in base a pattern ricorrenti di reazione stromale neoplastica. Per la definizione morfologica del pattern di stromatogenesi, sono state valutate la cellularità stromale e il grado di risposta fibropoietica.

Lo studio della stromatogenesi è stato effettuato anche attraverso la valutazione dei principali componenti dello stroma neoplastico: i fibroblasti tumore-associati (CAFs), la vascolarizzazione e l'infiltrato infiammatorio linfocitario.

Su ciascun caso, è stata effettuata la valutazione dei TILs stromali secondo il metodo e le raccomandazioni proposte dall'International TILs Working Group nel 2014<sup>245</sup>.

Su ciascuna neoplasia sono state infine effettuate la determinazione dell'espressione del recettore per Androgeni e la determinazione dell'espressione delle citocheratine ad alto peso molecolare CK5/6.

Le colorazioni immunoistochimiche sono state eseguite con l'immunocoloratore automatico Benchmark Ultra (Ventana Roche), secondo le specifiche e i protocolli forniti dal produttore. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali:

anti-PDGFR $\beta$  (rabbit monoclonal; clone Y92; Acris), anti-CD31 (PECAM-1) (mouse, clone JC70, Ventana), anti-Podoplanina-1 (mouse, clone D2-40, Ventana), anti-CD3 (rabbit, clone 2GV6, Ventana) e anti-CD8 (rabbit, clone SP57, Ventana), anti-PD-1 (mouse, clone NAT105, Ventana), anti-PD-L1 (mouse, clone 22C3, Dako), anti-recettore per androgeni (AR) (mouse, clone SP107, Ventana), anti-Cytokeratin 5/6 (mouse, clone D5/16B4, Ventana).

Sono stati effettuati controlli positivi e negativi per ciascuna colorazione immunoistochimica.

I vetrini allestiti sono stati osservati al microscopio ottico Leica DM2000 (obiettivi: 2,5X, 4X, 10X SL, HI PLAN 20X/0.40, HI PLAN 40X/0.65, HI PLAN 63X/0.75 e PL FLUOTAR 100X/1.30). I vetrini sono stati inoltre acquisiti digitalmente con lo scanner per vetrini istologici Aperio CS2, per una ulteriore analisi in digital pathology e per la realizzazione delle microfotografie digitali con il software Aperio ImageScope ver. 12 (Leica Microsystems).



### **3.1 Significato degli anticorpi impiegati e metodica di valutazione**

Con i marcatori CD31 e Podoplanina 1 è stato valutato il grado di vascolarizzazione rispettivamente complessiva e linfatica dello stroma intratumorale e peritumorale, stratificato in tre classi qualitative ordinali (lieve, moderata e elevata).

La valutazione immunohistochimica di PDGFR $\beta$  è stata effettuata in modo semiquantitativo sulla componente stromale, stratificando la percentuale di cellule stromali colorate in quattro classi ordinali: negativa, lieve, moderata e elevata. Particolare attenzione è stata posta circa la presenza di canali vascolari bordati da cellule neoplastiche PDGFR $\beta$ + indicanti la presenza di mimetismo vascolare; in questo modo è stato ottenuto tre classi ordinali: assenza di neovasi PDGFR $\beta$ +, rari neovasi bordati da cellule debolmente PDGFR $\beta$ + e frequenti neovasi moderatamente/intensamente PDGFR $\beta$ +

La valutazione immunohistochimica di PD-L1 è stata effettuata in modo semiquantitativo sulla componente neoplastica stratificando la percentuale di cellule colorate in quattro classi ordinali: negativa, lieve, moderata e intensa.

È stata determinata la percentuale di espressione di PD-L1 e di PD-1 nell'infiltrato linfocitario. Nello specifico si è proceduto alla valutazione dei linfociti PD-L1+ a diretto contatto con le cellule neoplastiche, determinando quattro classi ordinali in base alla percentuale di linfociti positivi: assenza di linfociti (0%), lieve (1-9%), moderata quantità (10-49%), elevata percentuale di linfociti a contatto con le cellule neoplastiche (50-100%).

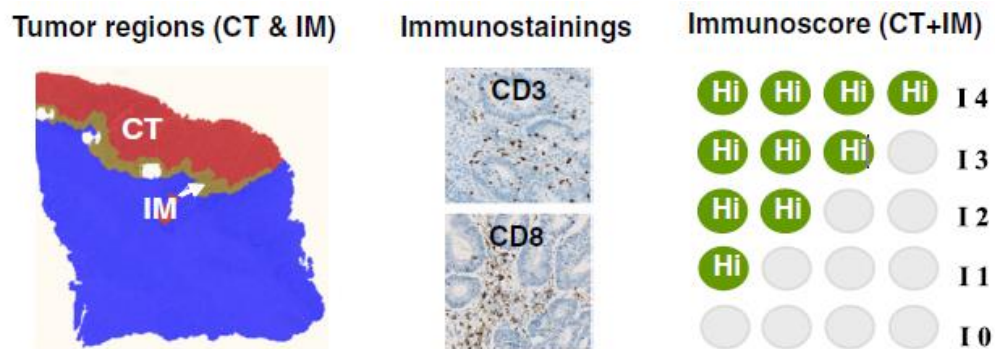
L'espressione del recettore androgenico nelle cellule neoplastiche è stata valutata in valore percentuale, stratificando la casistica in due classi ordinali: assente, presente; il cut-off di riferimento per considerare positiva la neoplasia è stato del 5%,

L'espressione delle citocheratine 5/6 nelle cellule neoplastiche è stata valutata come negativa o positiva, in riferimento a un cut-off del 10%. L'espressione delle citocheratine ad alto peso molecolare (definite anche citocheratine basali) è riportata dalla letteratura come marcatore dei carcinomi con fenotipo basal-like, tipicamente neoplasie di alto grado e triplo-negative nell'85% dei casi.

### 3.2 Determinazione dell'immunoscore

Per la determinazione dell'immunoscore, in riferimento agli studi di Galon et al<sup>8,142,253</sup>, sono stati utilizzati i marcatori T linfocitari CD3 e CD8, valutati quantitativamente effettuando conte cellulari per mm<sup>2</sup> (un mm<sup>2</sup> corrisponde alla somma di tre campi microscopici ad alto ingrandimento [HPF, 400x]), sia in corrispondenza delle porzioni centrali del tumore, sia in corrispondenza del fronte di avanzamento tumorale. Per le conte di linfociti CD3+ è stato assegnato un punteggio di 1 in presenza di un valore superiore a 144 cellule/mm<sup>2</sup> e superiore a 256/mm<sup>2</sup> rispettivamente nelle aree centrali e nel fronte di avanzamento della neoplasia; per le conte di linfociti CD8+ è stato assegnato un punteggio di 1 in presenza di un valore superiore a 50 cellule/mm<sup>2</sup> e superiore a 202/mm<sup>2</sup> rispettivamente nelle aree centrali e nel fronte di avanzamento della neoplasia.

L'immunoscore finale è stato ottenuto applicando lo schema riportato nella figura 3.1.



**Figura 3.1** – Definizione e metodologia dell'immunoscore. modificata da: Galon et al, Toward the introduction of the "Immunoscore" in the classification of malignant tumours. J Pathol 2014; 232:199-209.

### **3.3 Acquisizione e analisi dei dati**

L'analisi dei risultati ottenuti attraverso le valutazioni delle caratteristiche cliniche, morfologiche e immunohistochimiche è stata effettuata con l'ausilio del software Microsoft Excel 2016, per la tabellazione dei dati e la realizzazione dei grafici, e con il software IBM SPSS 21.0, utilizzando il test di Spearman, per le analisi di correlazione tra variabili quantitative e qualitative ordinali non parametriche.

Sono state analizzate le seguenti variabili:

Sottotipo immunofenotipico, istotipo, grading, dimensione del nodulo (cm), multifocalità, invasione vascolare, infiltrazione perineurale, necrosi, metastasi linfonodali presenza di carcinoma intraduttale associato (DCIS), pattern morfologico di reazione stromale, vascolarizzazione globale intratumorale, vascolarizzazione globale peritumorale, vascolarizzazione linfatica intratumorale, vascolarizzazione linfatica peritumorale, TILs, Immunoscore, linfociti CD3+ intratumorali, linfociti CD3+ peritumorali, linfociti CD8+ intratumorali, linfociti CD8+ peritumorali, linfociti PD1+ intratumorali, linfociti PD-L1+ intratumorali, espressione stromale di PDGFR $\beta$ , strutture vascolari PDGFR $\beta$ , espressione di PD-L1 nelle cellule neoplastiche, espressione di AR nelle cellule neoplastiche, espressione di CK5/6 nelle cellule neoplastiche, indice di proliferazione (Ki67) nelle cellule neoplastiche.

## 4. RISULTATI

La casistica in studio è rappresentata complessivamente da 240 casi di carcinoma invasivo della mammella NST, in accordo con i criteri diagnostici WHO 2019<sup>252</sup>.

I casi oggetto di studio sono stati selezionati retrospettivamente sulla base dell'espressione immunohistochimica del recettore per estrogeni (ER), del recettore per progesterone (PgR), del recettore 2 per il fattore di crescita epidermico umano (HER2) e dell'indice di proliferazione (MIB1/Ki67).

Sono stati così ottenuti i seguenti 5 sottotipi immunofenotipici numericamente omogenei, ciascuno costituito da 48 casi:

- Sottotipo Luminal A, definito sulla base delle positività per ER e/o PgR, negatività per Her2 e Ki67 < 14%.
- Sottotipo Luminal B Ki67-high, definito sulla base della positività per ER e/o PgR, Ki67  $\geq$  14%.
- Sottotipo Luminal B Her2+, definito sulla base della positività per ER e/o PgR e di HER2 (score 3+).
- Sottotipo Her2-enriched, definito sulla base della negatività per ER e PgR e positività per HER2 (score 3+).
- Sottotipo Triple-negative, definito sulla base della negatività per ER, PgR e HER2.

L'età media complessiva delle pazienti è di 61 anni (range 24 - 92 anni); la lesione tumorale mostrava un diametro maggiore medio di 2,2 cm (range 0,2 - 13 cm).

I dati ottenuti sono riportati nella tabella 4.1.

|  | <i>Luminal A</i>  | <i>Luminal B<br/>Ki67-high</i> | <i>Luminal B<br/>Her2+</i> | <i>HER2-<br/>enriched</i> | <i>Triple<br/>negative</i> |
|--|-------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| <b>Età media (range)</b>                                 | 63 (49-74)        | 53 (37-66)                     | 66 (42-88)                 | 61 (33-72)                | 60 (24)92                  |
| <b>Dimensioni medie<br/>tumore, cm (range)</b>           | 1,5 (0,6-<br>4,8) | 1,8 (1-2,6)                    | 3,1 (0,2-8)                | 1,8 (0,5-3)               | 2,6 (0,2-13)               |
| <b>Grading</b>   |                   |                                |                            |                           |                            |
| <i>G1</i>  | 54%               | 0                              | 0                          | 0                         | 0                          |
| <i>G2</i>  | 46%               | 90%                            | 46%                        | 38%                       | 17%                        |
| <i>G3</i>  | 0                 | 10%                            | 54%                        | 62%                       | 83%                        |
| <b>Pattern morfologico<br/>di reazione stromale</b>      |                   |                                |                            |                           |                            |
| <i>A</i>   | 25%               | 33%                            | 21%                        | 44%                       | 21%                        |
| <i>B</i>   | 31%               | 54%                            | 79%                        | 25%                       | 35%                        |
| <i>C</i>   | 44%               | 13%                            | 0                          | 21%                       | 36%                        |
| <i>D</i>   | 0                 | 0                              | 0                          | 10%                       | 8%                         |
| <b>Necrosi</b>   |                   |                                |                            |                           |                            |
| <i>Assente</i>   | 100%              | 100%                           | 90%                        | 25%                       | 58%                        |
| <i>Presente</i>  | 0                 | 0                              | 10%                        | 75%                       | 42%                        |
| <b>Invasione<br/>angiolinfatica</b>                      |                   |                                |                            |                           |                            |
| <i>Assente</i>   | 100%              | 24%                            | 54%                        | 62%                       | 75%                        |
| <i>Presente</i>  | 0                 | 76%                            | 46%                        | 38%                       | 25%                        |
| <b>Metastasi linfonodali</b>                             |                   |                                |                            |                           |                            |
| <i>Assenti</i>   | 100%              | 67%                            | 58%                        | 73%                       | 88%                        |
| <i>Presenti</i>  | 0                 | 33%                            | 42%                        | 27%                       | 13%                        |
| <b>Infiltrazione<br/>perineurale</b>                     |                   |                                |                            |                           |                            |
| <i>Assente</i>   | 54%               | 65%                            | 90%                        | 81%                       | 90%                        |
| <i>Presente</i>  | 46%               | 35%                            | 10%                        | 19%                       | 10%                        |
| <b>DCIS associato</b>                                    |                   |                                |                            |                           |                            |
| <i>Assente</i>   | 44%               | 33%                            | 10%                        | 27%                       | 67%                        |
| <i>Presente</i>  | 56%               | 67%                            | 90%                        | 73%                       | 33%                        |
| <b>Multifocalità</b>                                     |                   |                                |                            |                           |                            |
| <i>Assente</i>   | 77%               | 88%                            | 52%                        | 73%                       | 92%                        |
| <i>Presente</i>  | 23%               | 13%                            | 48%                        | 27%                       | 8%                         |
| <b>Vascularizzazione<br/>linfatica peritumorale</b>      |                   |                                |                            |                           |                            |
| <i>Lieve</i>   | 77%               | 77%                            | 88%                        | 63%                       | 56%                        |
| <i>Intermedia</i>  | 23%               | 23%                            | 8%                         | 27%                       | 31%                        |
| <i>Elevata</i>   | 0                 | 0                              | 4%                         | 10%                       | 13%                        |
| <b>Vascularizzazione<br/>linfatica<br/>intratumorale</b> |                   |                                |                            |                           |                            |
| <i>Lieve</i>   | 90%               | 77%                            | 88%                        | 19%                       | 52%                        |
| <i>Intermedia</i>  | 0                 | 13%                            | 8%                         | 46%                       | 33%                        |
| <i>Elevata</i>   | 10%               | 10%                            | 4%                         | 35%                       | 15%                        |

|   | <i>Luminal A</i> | <i>Luminal B<br/>Ki67-high</i> | <i>Luminal B<br/>Her2+</i> | <i>HER2-<br/>enriched</i> | <i>Triple<br/>negative</i> |
|---|------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| <b>Vascularizzazione complessiva peritumorale</b>   |                  |                                |                            |                           |                            |
| <i>Lieve</i>  | 100%             | 90%                            | 67%                        | 48%                       | 48%                        |
| <i>Intermedia</i>                                   | 0                | 10%                            | 33%                        | 52%                       | 35%                        |
| <i>Elevata</i>                                      | 0                | 0                              | 0                          | 0                         | 17%                        |
| <b>Vascularizzazione complessiva intratumorale</b>  |                  |                                |                            |                           |                            |
| <i>Lieve</i>  | 33%              | 54%                            | 21%                        | 0                         | 17%                        |
| <i>Intermedia</i>                                   | 56%              | 0                              | 52%                        | 73%                       | 50%                        |
| <i>Elevata</i>                                      | 10%              | 46%                            | 27%                        | 27%                       | 33%                        |
| <b>Espressione stromale PDGFR<math>\beta</math></b> |                  |                                |                            |                           |                            |
| <i>Assente</i>                                      | 100%             | 81%                            | 79%                        | 52%                       | 15%                        |
| <i>Lieve</i>  | 0                | 19%                            | 21%                        | 48%                       | 67%                        |
| <i>Moderata</i>                                     | 0                | 0                              | 0                          | 0                         | 13%                        |
| <i>Elevata</i>                                      | 0                | 0                              | 0                          | 0                         | 6%                         |
| <b>Vasi PDGFR<math>\beta</math>+</b>                |                  |                                |                            |                           |                            |
| <i>Assenti</i>                                      | 100%             | 100%                           | 92%                        | 88%                       | 85%                        |
| <i>Bassa densità</i>                                | 0                | 0                              | 8%                         | 6%                        | 8%                         |
| <i>Medio-alta densità</i>                           | 0                | 0                              | 0                          | 6%                        | 7%                         |
| <b>Immunoscore</b>                                  |                  |                                |                            |                           |                            |
| <i>i0</i>   | 77%              | 38%                            | 29%                        | 8%                        | 15%                        |
| <i>i1</i>   | 23%              | 31%                            | 23%                        | 33%                       | 17%                        |
| <i>i2</i>   | 0                | 31%                            | 25%                        | 50%                       | 21%                        |
| <i>i3</i>   | 0                | 0                              | 13%                        | 0                         | 10%                        |
| <i>i4</i>   | 0                | 0                              | 10%                        | 9%                        | 31%                        |
| <b>Linfociti PD1+ intratumorali</b>                 |                  |                                |                            |                           |                            |
| <i>Assenti</i>                                      | 100%             | 90%                            | 83%                        | 40%                       | 71%                        |
| <i>Bassi</i>  | 0                | 10%                            | 17%                        | 42%                       | 21%                        |
| <i>Intermedi</i>                                    | 0                | 0                              | 0                          | 8%                        | 4%                         |
| <i>Elevati</i>                                      | 0                | 0                              | 0                          | 10%                       | 4%                         |
| <b>Linfociti PDL1+ intratumorali</b>                |                  |                                |                            |                           |                            |
| <i>Assenti</i>                                      | 90%              | 90%                            | 79%                        | 83%                       | 46%                        |
| <i>Bassi</i>  | 10%              | 10%                            | 21%                        | 0                         | 27%                        |
| <i>Intermedi</i>                                    | 0                | 0                              | 0                          | 17%                       | 19%                        |
| <i>Elevati</i>                                      | 0                | 0                              | 0                          | 0                         | 8%                         |
| <b>TILs</b>   |                  |                                |                            |                           |                            |
| <i>Assenti</i>                                      | 54%              | 11%                            | 0                          | 0                         | 12%                        |
| <i>Bassi</i>  | 13%              | 10%                            | 40%                        | 13%                       | 21%                        |
| <i>Intermedi</i>                                    | 33%              | 79%                            | 29%                        | 46%                       | 44%                        |
| <i>Elevati</i>                                      | 0                | 0                              | 31%                        | 41%                       | 23%                        |

|  | <i>Luminal A</i> | <i>Luminal B<br/>Ki67-high</i> | <i>Luminal B<br/>Her2+</i> | <i>HER2-<br/>enriched</i> | <i>Triple<br/>negative</i> |
|--|------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| <b>Espressione recettore<br/>per androgeni</b> |                  |                                |                            |                           |                            |
| <i>Assente</i>                                 | 10%              | 13%                            | 44%                        | 44%                       | 69%                        |
| <i>Presente</i>                                | 90%              | 87%                            | 56%                        | 56%                       | 31%                        |
| <b>Espressione CK 5/6</b>                      |                  |                                |                            |                           |                            |
| <i>Assente</i>                                 | 100%             | 100%                           | 96%                        | 92%                       | 54%                        |
| <i>Presente</i>                                | 0                | 0                              | 4%                         | 8%                        | 46%                        |

**Tabella 4.1** – Nella tabella sono riportati i risultati delle valutazioni dei parametri clinici, morfologici e immunofenotipici nei cinque gruppi immunofenotipici, riportati in valori percentuali.

## 4.1 Pattern morfologici di stromatogenesi neoplastica

Indipendentemente dalla suddivisione in gruppi immunofenotipici, i casi in studio sono stati stratificati sulla base del pattern morfologico di reazione stromale [Grafico 4.1], in quattro classi così definite:

Pattern A, comprendente 69 casi (29%), definito dalla presenza di abbondante quantità di stroma con setti di fibre collagene riccamente cellulati (reazione desmoplastica) [Figura 4.1a]. È stato il secondo pattern più frequentemente riscontrato e il più frequente nei carcinomi HER2-enriched (44%).

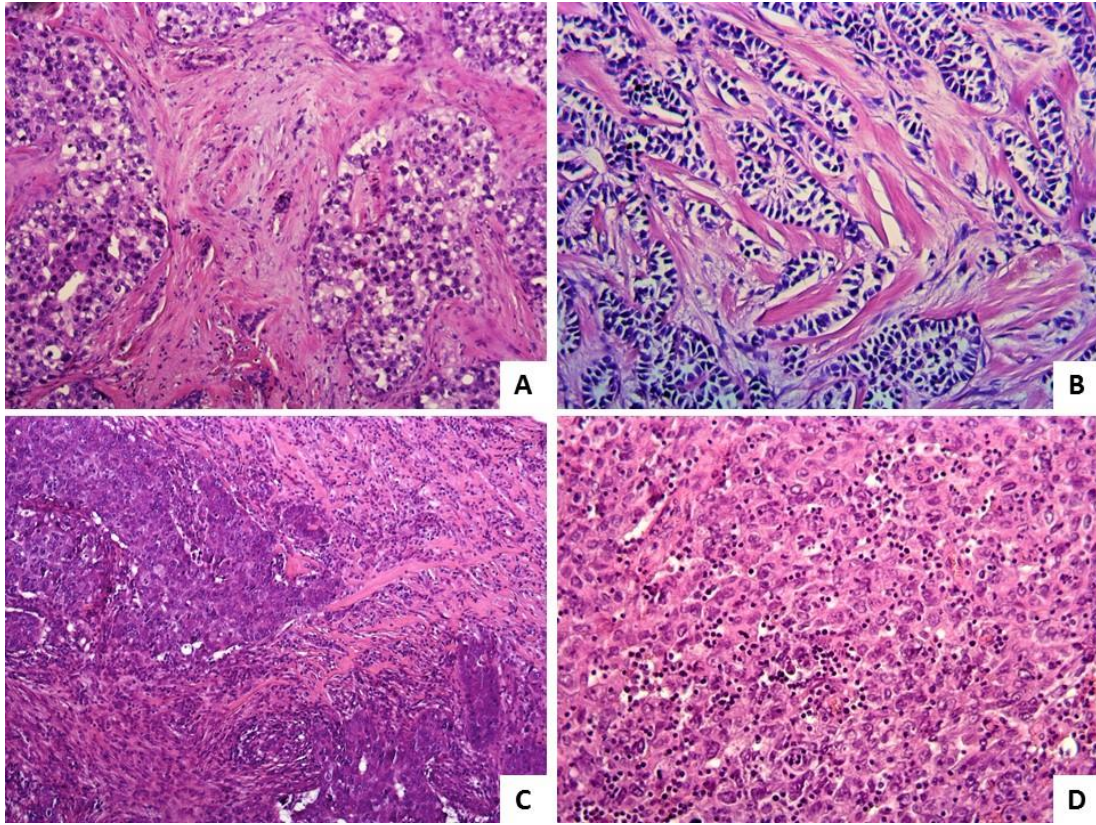
Pattern B, comprendente 108 casi (45%), definito dalla presenza di abbondanti quantità di stroma fibro-sclerotico, acellulato o scarsamente cellulato [Figura 4.1b]. È stato il pattern più frequentemente osservato nell'intera casistica e il pattern più frequente nei carcinomi Luminali B Ki67high (54%) e nei carcinomi Luminali B Her2+ (70%) [Grafico 4.2].

Pattern C, comprendente 54 casi (22%), definito dalla presenza di uno stroma lievemente/moderatamente rappresentato e lievemente cellulato [Figura 4.1c]. È stato il pattern più frequentemente osservato nei carcinomi Luminal A (44%). Tale pattern non è stato riscontrato nei carcinomi Luminali B Her2+.

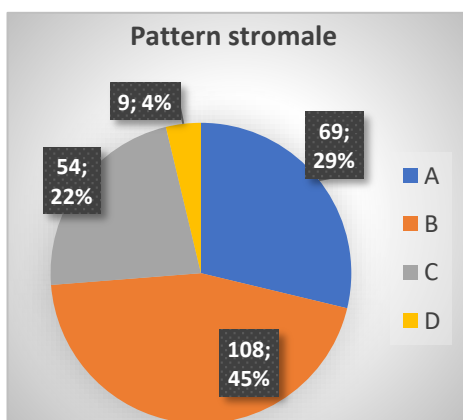
Pattern D, comprendente 9 casi (4%), definito dalla presenza di una scarsa/assente reazione stromale di tipo collagenopoiatico-fibrotico, con noduli tumorali sepimentati da rari e sottili setti fibrovascolari [Figura 4.1d]. Questo pattern, sebbene il meno frequente, è stato osservato solo nei carcinomi Her2-enriched (10%) e nei carcinomi triplo-negativi (8%).

Non è stata evidenziata una correlazione statisticamente significativa tra il pattern morfologico di stromatogenesi neoplastica e il gruppo immunofenotipico [Grafico 4.2] né con gli altri parametri valutati, sebbene il pattern B (pattern fibro-sclerotico) è stato quello più frequentemente osservato nei carcinomi luminali B e il pattern D (scarsa reazione stromale fibropoiatica).

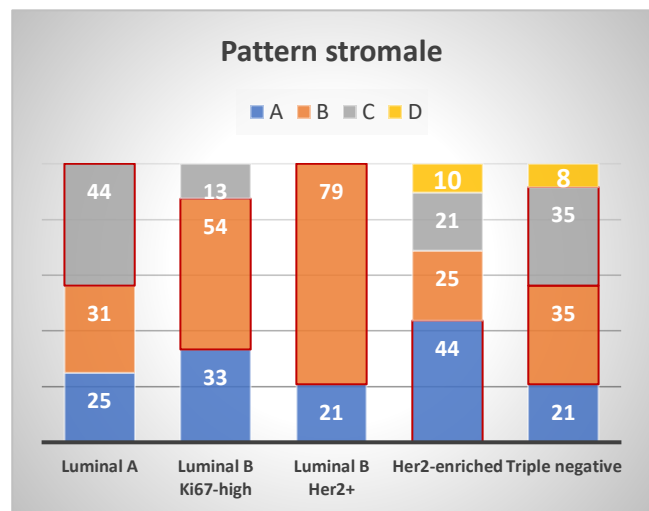




**Figura 4.1** – (A) Pattern stromale A: carcinoma duttale invasivo NST G3, Her2-enriched; (B) Pattern stromale B: carcinoma duttale invasivo NST G1, Luminal A; (C) Pattern stromale C: carcinoma duttale invasivo NST G3, Triple negative; (D) Pattern stromale D: carcinoma duttale invasivo NST G3, Triple negative. Ematossilia-eosina. Ingrandimenti originali: (a) 100X; (b,c,d) 200x.



**Grafico 4.1** – Frequenza dei pattern stromali.



**Grafico 4.2** – Distribuzione dei pattern stromali nei quattro gruppi immunofenotipici.

## 4.2 Variabili morfologiche e immunoistochimiche

### Luminal A

L'età media delle pazienti era di 69 anni (range 49-74 anni).

Le dimensioni medie del nodulo neoplastico erano di 1,5 cm (0,6-4,8 cm).

Il 54% dei carcinomi mostrava un grado G1, il 46% un grado G2 [Grafico 4.3].

In nessun caso sono state evidenziate necrosi tumorale, invasione vascolare e metastasi linfonodali [Grafici 4.4, 4.5, 4.6].

Nel 46% dei carcinomi Luminal A è stata evidenziata la presenza di infiltrazione perineurale. Nel 56% coesistevano aree di carcinoma duttale in situ associato al carcinoma invasivo [Grafico 4.7]. Nel 23% dei casi la neoplasia mostrava distribuzione bi- o multifocale [Grafico 4.8].

Il grado di vascolarizzazione linfatica peritumorale, valutata con la Podoplanina 1 (D2-40), risultava basso nel 77% e moderato nel 23% dei casi; in nessun caso è stato osservato un aumento marcato della vascolarizzazione linfatica peritumorale [Grafico 4.9].

La vascolarizzazione linfatica intratumorale risultava lievemente aumentata nel 90% e marcatamente incrementata nel 10% dei casi; in nessun caso è stato riscontrato un aumento moderato [Grafico 4.10].

La vascolarizzazione complessiva peritumorale, valutata con CD31, risultava lievemente incrementata in tutti i casi; nessun caso mostrava aumento complessivo moderato o marcato dei vasi peritumorali [Grafico 4.11].

La vascolarizzazione complessiva intratumorale mostrava un incremento lieve nel 33%, moderato nel 56% e marcato nell'11% [Grafico 4.12].

Il 52% dei casi mostra uno stroma con lieve immunoreattività per PDGFR $\beta$ ; mentre il restante 48% non mostra immunoreattività per il marcatore [Grafico 4.13].

Nessun caso mostrava immunoreattività per PDGFR $\beta$  nella componente neoplastica, né sono stati evidenziati neovasi bordati da cellule neoplastiche PDGFR $\beta$ + [Grafico 4.14].

In nessun caso di carcinoma luminal A sono stati riscontrati linfociti PD-1+ [Grafico 4.15].

Sono stati osservati bassi livelli di linfociti intratumorali PD-L1+ nel 10% dei casi, il restante 90% dei casi non mostrava linfociti PD-L1+ [Grafico 4.16].

Per quanto riguarda l'espressione di PD-L1 nella componente neoplastica, è stata riscontrata una positività lieve nel 10%, moderata nel 65%, intensa nel 13% dei casi, assente nel 13% dei casi [Grafico 4.17].

L'immunoscore risultava i0 nel 77%, i1 nel 23% dei casi. Non sono stati evidenziati valori di immunoscore i2, i3 o i4 [Grafici 4.18, 4.19, 4.20].

I TILs stromali valutati su base morfologica nelle sezioni in ematossilina/eosina risultavano assenti nel 54% dei casi, erano presenti in bassa percentuale nel 13% e in percentuale intermedia nel 33% dei casi [Grafico 4.21].

Il 90% dei carcinomi Luminali A esprimeva il recettore per androgeni, con un valore medio di positività del 68% nelle cellule neoplastiche [Grafico 4.22].

Tutti i casi erano negativi per le Citocheratine 5/6 [Grafico 4.3].

#### Luminal B Ki67-high

L'età media delle pazienti era di 53 anni (range 37-76 anni).

Le dimensioni medie del nodulo neoplastico erano di 1,8 cm (1-2,6 cm).

Il 90% dei carcinomi mostrava un grado G2, il 10% un grado G3 [Grafico 4.3].

In nessun caso è stata evidenziata necrosi tumorale [Grafico 4.4].

Nel 76% dei casi era presente invasione vascolare e nel 33% si osservavano metastasi linfonodali [Grafici 4.5, 4.6].

Nel 35% dei carcinomi Luminal B Ki67high è stata evidenziata la presenza di infiltrazione perineurale. Nel 67% coesistevano aree di carcinoma duttale in situ associato al carcinoma invasivo [Grafico 4.7]. Nel 13% dei casi la neoplasia mostrava distribuzione bi- o multifocale [Grafico 4.8].

Il grado di vascolarizzazione linfatica peritumorale, valutata con la Podoplanina 1 (D2-40), risultava basso nel 77% e moderato nel 23% dei casi; in nessun caso è stato osservato un aumento marcato della vascolarizzazione linfatica peritumorale [Grafico 4.9].

La vascolarizzazione linfatica intratumorale risultava lievemente aumentata nel 77%, moderatamente incrementata nel 13% e marcatamente aumentata nel 10% dei casi [Grafico 4.10].

La vascolarizzazione complessiva peritumorale, valutata con CD31, risultava lievemente incrementata nel 90% e moderatamente incrementata nel 10% dei casi; nessun caso

mostrava aumento complessivo marcato della densità vascolare peritumorale [Grafico 4.11].

La vascolarizzazione complessiva intratumorale mostra un incremento lieve nel 54% e marcato nel 46% [Grafico 4.12].

Il 79% dei casi mostrava uno stroma con lieve immunoreattività per PDGFR $\beta$ ; mentre il restante 21% non mostrava immunoreattività per il marcatore [Grafico 4.13].

Nessun caso ha mostrato immunoreattività per PDGFR $\beta$  nella componente neoplastica, né sono stati evidenziati neovasi bordati da cellule neoplastiche PDGFR $\beta$ + [Grafico 4.14].

Nel 10% dei carcinomi luminal B Ki67-high sono stati riscontrate basse percentuali di linfociti PD-1+ a contatto con la componente neoplastica, mentre la grande maggioranza non mostrava linfociti PD-1+ intratumorali [Grafico 4.15].

Sono stati osservati bassi livelli di linfociti intratumorali PD-L1+ nel 10% dei casi, il restante 90% dei casi non mostrava linfociti PD-L1+ [Grafico 4.16].

Per quanto riguarda l'espressione di PD-L1 nella componente neoplastica, è stata riscontrata una positività lieve nel 56% e moderata nel 33% dei casi [Grafico 4.17].

L'immunoscore risultava i0 nel 38%, i1 nel 31%, i2 nel 31% dei casi. Non sono stati evidenziati valori di immunoscore i3 o i4 [Grafici 4.18, 4.19, 4.20].

I TILs stromali valutati su base morfologica nelle sezioni in ematossilina/eosina risultavano assenti nel 10% dei casi, presenti in bassa percentuale nel 10% e in percentuale intermedia nel 79% dei casi [Grafico 4.21].

L'88% dei carcinomi Luminal B Ki67high esprimeva il recettore per androgeni, con un valore medio di positività del 75% nelle cellule neoplastiche [Grafico 4.22].

Tutti i casi erano negativi per le Citocheratine 5/6 [Grafico 4.23].

### Luminal B Her2+

L'età media delle pazienti era di 66 anni (range 42-88 anni).

Le dimensioni medie del nodulo neoplastico erano di 3,1 cm (0,2-8 cm).

Il 54% dei carcinomi mostrava un grado G3, il 46% un grado G2 [Grafico 4.3].

Nel 10% dei casi è stata osservata la presenza di necrosi tumorale [Grafico 4.4].

Nel 46% dei casi era presente invasione vascolare e nel 42% si osservavano metastasi linfonodali [Grafici 4.5, 4.6].

Nel 10% dei carcinomi Luminal B Her2+ è stata evidenziata la presenza di infiltrazione perineurale. Nel 90% dei casi coesistevano aree di carcinoma duttale in situ associato al carcinoma invasivo [Grafico 4.7]. Nel 48% dei casi la neoplasia mostrava distribuzione bi- o multifocale [Grafico 4.8].

La vascolarizzazione linfatica peritumorale, valutata con la Podoplanina 1 (D2-40), risultava lievemente aumentata nel 88%, moderatamente aumentata nel 8% e marcatamente aumentata nel 4% dei casi [Grafico 4.9].

La vascolarizzazione linfatica intratumorale risultava lievemente aumentata nel 88%, moderatamente aumentata nel 8% e marcatamente aumentata nel 4% dei casi [Grafico 4.10].

La vascolarizzazione complessiva peritumorale, valutata con CD31, risultava lievemente incrementata nel 67% e moderatamente incrementata nel 33% dei casi; nessun caso mostrava aumento complessivo marcato della densità vascolare peritumorale [Grafico 4.11].

La vascolarizzazione complessiva intratumorale mostrava un incremento lieve nel 21%, moderato nel 52% e marcato nel 27% dei casi [Grafico 4.12].

L'81% dei casi mostrava uno stroma con lieve immunoreattività per PDGFR $\beta$ ; mentre il restante 19% non mostrava immunoreattività per il marcatore [Grafico 4.13].

L'8% dei casi mostrava lieve immunoreattività per PDGFR $\beta$  nella componente neoplastica [Grafico 4.14].

Nel 17% dei carcinomi Luminal B Her2+ sono state riscontrate basse percentuali di linfociti PD-1+ a contatto con la componente neoplastica [Grafico 4.15].

Sono stati osservati bassi livelli di linfociti intratumorali PD-L1+ nel 21% dei casi, il restante 79% dei casi non mostrava linfociti PD-L1+ [Grafico 4.16].

Per quanto riguarda l'espressione di PD-L1 nella componente neoplastica, è stata riscontrata una positività lieve nel 15% e moderata nel 15% dei casi [Grafico 4.17].

L'immunoscore risultava i0 nel 29%, i1 nel 23%, i2 nel 25%, i3 nel 13%, i4 nel 10% dei casi [Grafici 4.18, 4.19, 4.20].

I TILs stromali valutati su base morfologica nelle sezioni in ematossilina/eosina erano presenti in bassa percentuale nel 40%, in percentuale intermedia nel 29%, in percentuale elevata nel 31% dei casi [Grafico 4.21].

Il 56% dei carcinomi Luminal B Her2+ esprimeva il recettore per androgeni, con un valore medio di positività del 66% nelle cellule neoplastiche [Grafico 4.22].

Nel 4% dei casi è stata osservata una debole positività per le Citocheratine 5/6 nelle cellule neoplastiche [Grafico 4.23].

### Her2-enriched

L'età media delle pazienti era di 61 anni (range 33-72 anni).

Le dimensioni medie del nodulo neoplastico erano di 1,8 cm (0,5-3 cm).

Il 62% dei carcinomi mostrava un grado G3, il 38% un grado G2 [Grafico 4.3].

Nel 75% dei casi è stata osservata la presenza di necrosi tumorale [Grafico 4.4].

Nel 38% dei casi era presente invasione vascolare e nel 27% si osservavano metastasi linfonodali [Grafici 4.5, 4.6].

Nel 19% dei carcinomi Her2-enriched è stata evidenziata la presenza di infiltrazione perineurale. Nel 73% coesistevano aree di carcinoma duttale in situ associato al carcinoma invasivo [Grafico 4.7]. Nel 27% dei casi la neoplasia mostrava distribuzione bi- o multifocale [Grafico 4.8].

La vascolarizzazione linfatica peritumorale, valutata con la Podoplanina 1 (D2-40), risultava lievemente aumentata nel 63%, moderatamente aumentata nel 27% e marcatamente aumentata nel 10% dei casi [Grafico 4.9].

La vascolarizzazione linfatica intratumorale risultava lievemente aumentata nel 19%, moderatamente incrementata nel 46% e marcatamente aumentata nel 35% dei casi [Grafico 4.10].

La vascolarizzazione complessiva peritumorale, valutata con CD31, risultava lievemente incrementata nel 48% e moderatamente incrementata nel 52% dei casi; nessun caso mostrava aumento complessivo marcato dei vasi peritumorali [Grafico 4.11].

La vascolarizzazione complessiva intratumorale mostra un incremento moderato nel 73% e marcato nel 27% dei casi [Grafico 4.12].

Nel 12% dei casi sono stati evidenziati strutture vascolari bordate da cellule PDGFR $\beta$ + [Grafico 4.13].

Tutti i carcinomi del gruppo Her2-enriched mostravano uno stroma lievemente immunoreattivo per PDGFR $\beta$  [Grafico 4.14].

Il 42% dei casi mostrava rari e occasionali linfociti PD-1+; nell'8% e nel 10% dei casi erano presenti rispettivamente percentuali intermedie e alte di linfociti intratumorali PD-1+ [Grafico 4.15].

Sono stati osservate percentuali intermedie di linfociti intratumorali PD-L1+ nel 17% dei casi, il restante 83% dei casi non mostrava linfociti PD-L1+ [Grafico 4.16].

Per quanto riguarda l'espressione di PD-L1 nella componente neoplastica, è stata riscontrata una positività lieve nel 38% e moderata nel 46% dei casi [Grafico 4.17].

L'immunoscore risultava i0 nel 8%, i1 nel 33%, i2 nel 50%, i4 nell'8% dei casi. Non sono stati evidenziati valori di immunoscore i3 [Grafici 4.18, 4.19, 4.20].

I TILs stromali valutati su base morfologica nelle sezioni in ematossilina/eosina erano presenti in bassa percentuale nel 13%, in percentuale intermedia nel 46% e in percentuale elevata nel 41% dei casi [Grafico 4.21].

Il 56% dei carcinomi Her2-enriched esprimeva il recettore per androgeni, con un valore medio di positività del 50% nelle cellule neoplastiche [Grafico 4.22].

Nell'8% dei casi è stata osservata una debole positività per le Citocheratine 5/6 nelle cellule neoplastiche [Grafico 4.23].

### Triple negative

L'età media delle pazienti era di 60 anni (range 24-92 anni).

Le dimensioni medie del nodulo neoplastico erano di 2,6 cm (0,2-13 cm).

L'83% dei carcinomi mostrava un grado G3, il 17% un grado G2 [Grafico 4.3].

Nel 42% dei casi è stata osservata la presenza di necrosi tumorale [Grafico 4.4].

Nel 25% dei casi era presente invasione vascolare e nel 13% si osservavano metastasi linfonodali [Grafici 4.5, 4.6].

Nel 10% dei carcinomi Triple-negative è stata evidenziata la presenza di infiltrazione perineurale. Nel 33% coesistevano aree di carcinoma duttale in situ associato al carcinoma invasivo [Grafico 4.7]. Nell'8% dei casi la neoplasia mostrava distribuzione bi- o multifocale [Grafico 4.8].

La vascolarizzazione linfatica peritumorale, valutata con la Podoplanina 1 (D2-40), risultava lievemente aumentata nel 56%, moderatamente aumentata nel 31% e marcatamente aumentata nel 13% dei casi [Grafico 4.9].

La vascolarizzazione linfatica intratumorale risultava lievemente aumentata nel 52%, moderatamente aumentata nel 33% e marcatamente aumentata nel 15% dei casi [Grafico 4.10].

La vascolarizzazione complessiva peritumorale, valutata con CD31, mostrava un incremento lieve nel 48%, moderato nel 35% e marcato nel 17% dei casi [Grafico 4.11].

La vascolarizzazione complessiva intratumorale mostrava un incremento lieve nel 17%, moderato nel 50% e marcato nel 33% dei casi [Grafico 4.12].

Nei casi di carcinoma triple-negativo è stata rilevata una immunoreattività stromale per PDGFR $\beta$  lieve nel 67%, moderata nel 13% e intensa nel 6% dei casi [Grafico 4.13].

Nell'8% dei casi sono stati riscontrati occasionali neovasi bordati da cellule neoplastiche lievemente reattive per PDGFR $\beta$ ; nel 6% dei casi è stata riscontrata una discreta densità di neovasi bordati da cellule neoplastiche reattive per PDGFR $\beta$  [Grafico 4.14].

Nel 71% dei Triple negative non erano presenti linfociti PD-1+ a contatto con il tumore. Il 21% dei casi mostrava rari linfociti PD-1+ a contatto con le cellule carcinomatose, nel 4% e nel 4% sono stati riscontrate rispettivamente percentuali intermedie ed elevati di linfociti PD-1+ [Grafico 4.15].

Sono stati osservati bassi livelli di linfociti intratumorali PD-L1+ nel 27%, livelli intermedi nel 19% ed elevati nell'8% dei casi, il restante 46% dei casi non mostrava linfociti PD-L1+ [Grafico 4.16].

Per quanto riguarda l'espressione di PD-L1 nella componente neoplastica, questa risultava negativa nel 79% dei casi. È stata riscontrata una positività lieve nel 15%, e moderata nel 6% [Grafico 4.17].

L'immunoscore risultava i0 nel 15%, i1 nel 17%, i2 nel 21%, i3 nel 17% e i4 nel 31% dei casi [Grafici 4.18, 4.19, 4.20].

I TILs stromali valutati su base morfologica nelle sezioni in ematossilina/eosina risultavano assenti nel 13% dei casi, erano presenti in bassa percentuale nel 21%, in percentuale intermedia nel 44% e in percentuale elevata nel 23% dei casi [Grafico 4.21].

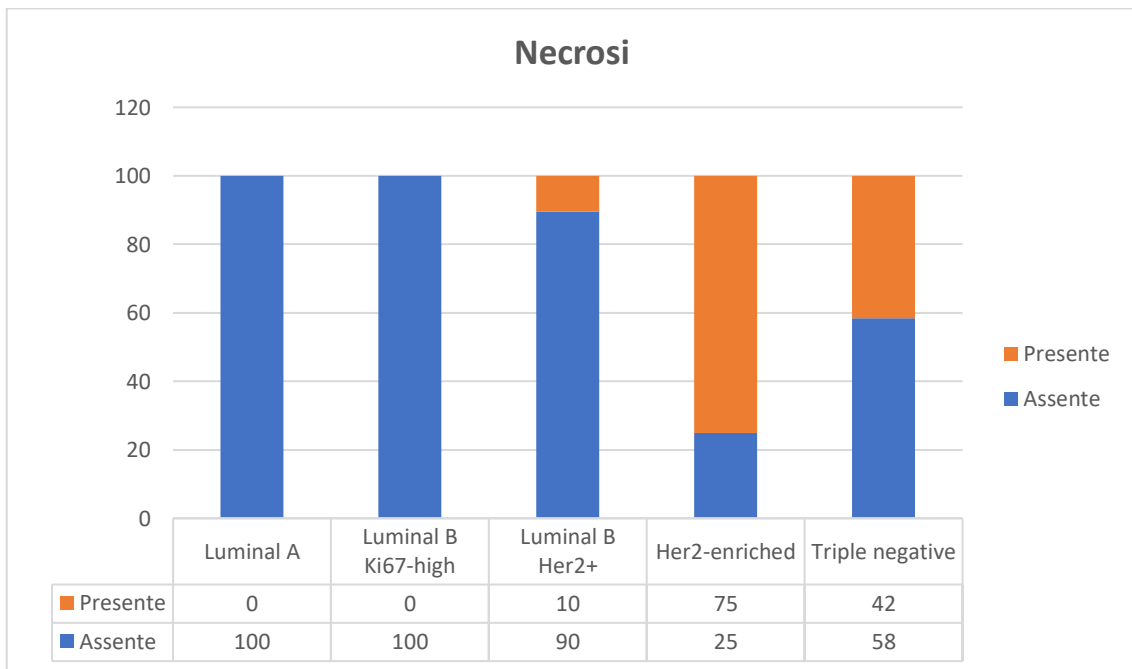
Il 31% dei carcinomi triplo-negativi esprimeva il recettore per androgeni, con un valore medio di positività del 63,5% nelle cellule neoplastiche [Grafico 4.22].

Il 46% dei casi mostrava positività per le Citocheratine 5/6 nelle cellule neoplastiche [Grafico 4.23].

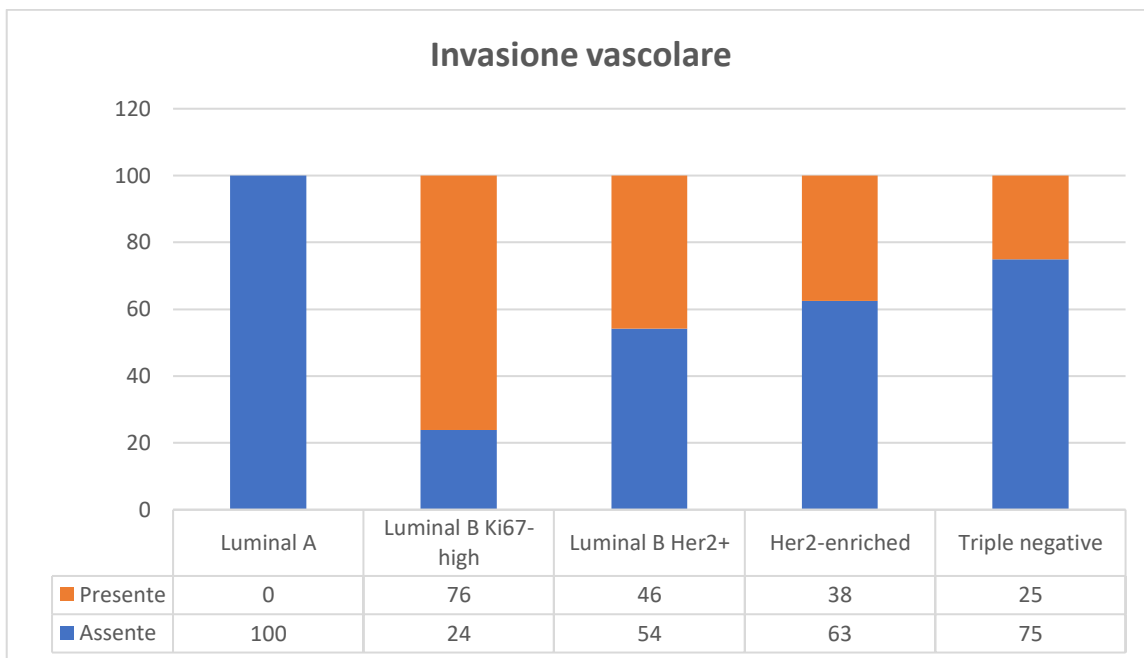




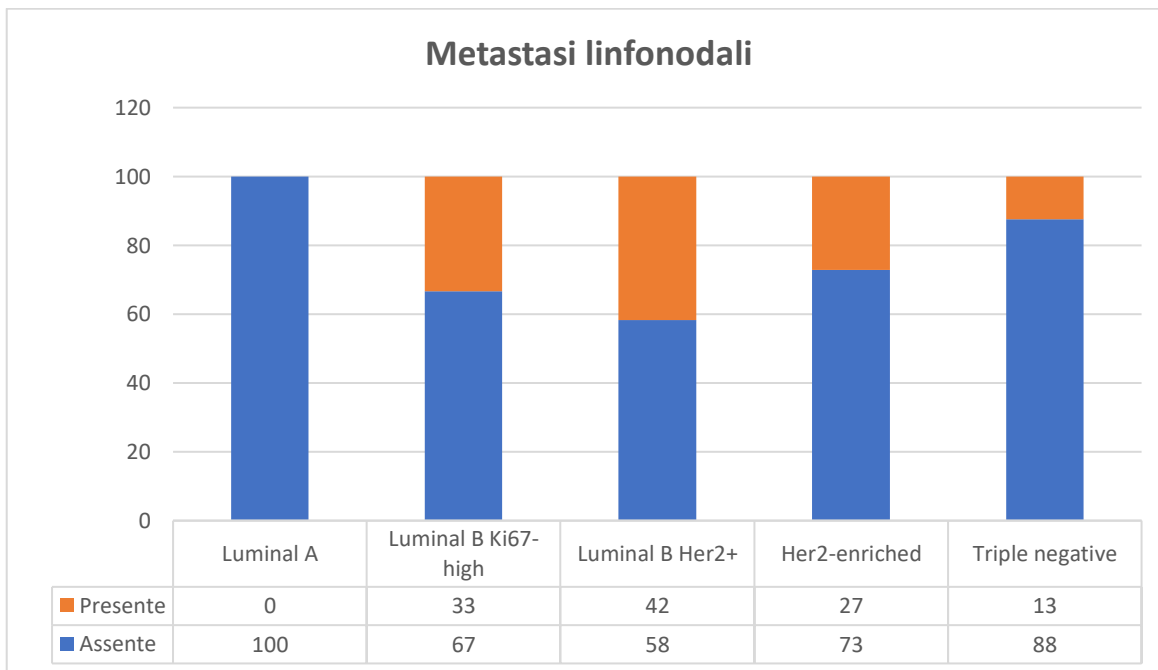
**Grafico 4.3** – Grado tumorale determinato con il sistema di grading istologico combinato sec. Nottingham.



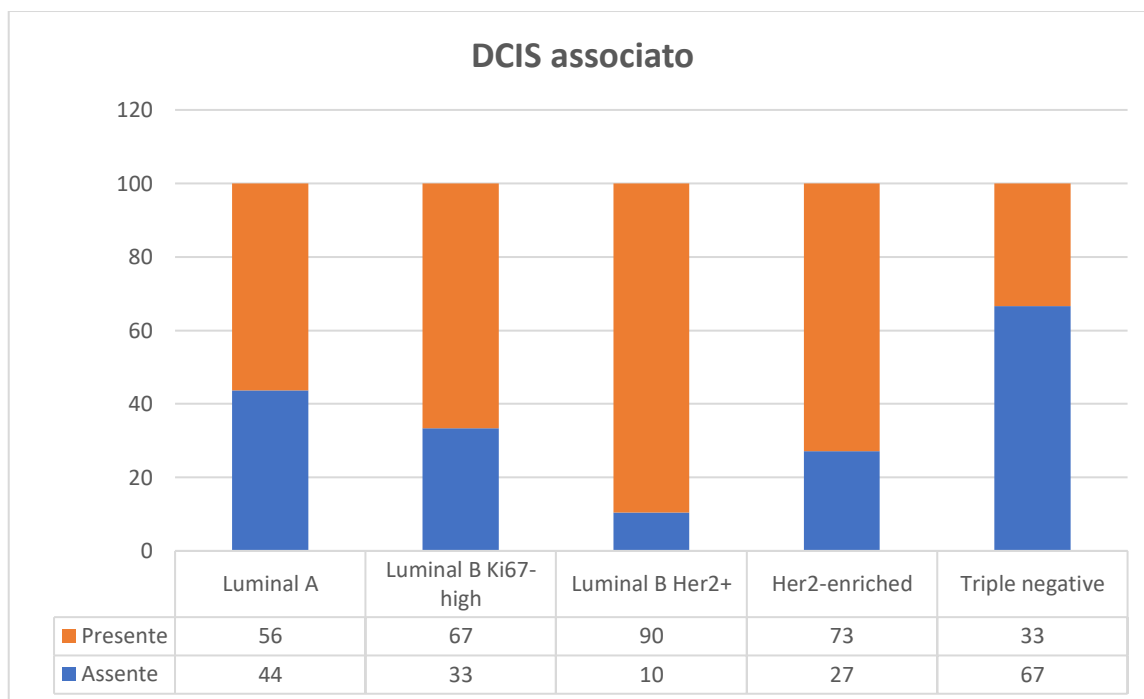
**Grafico 4.4** – Presenza di necrosi tumorale nei gruppi immunofenotipici.



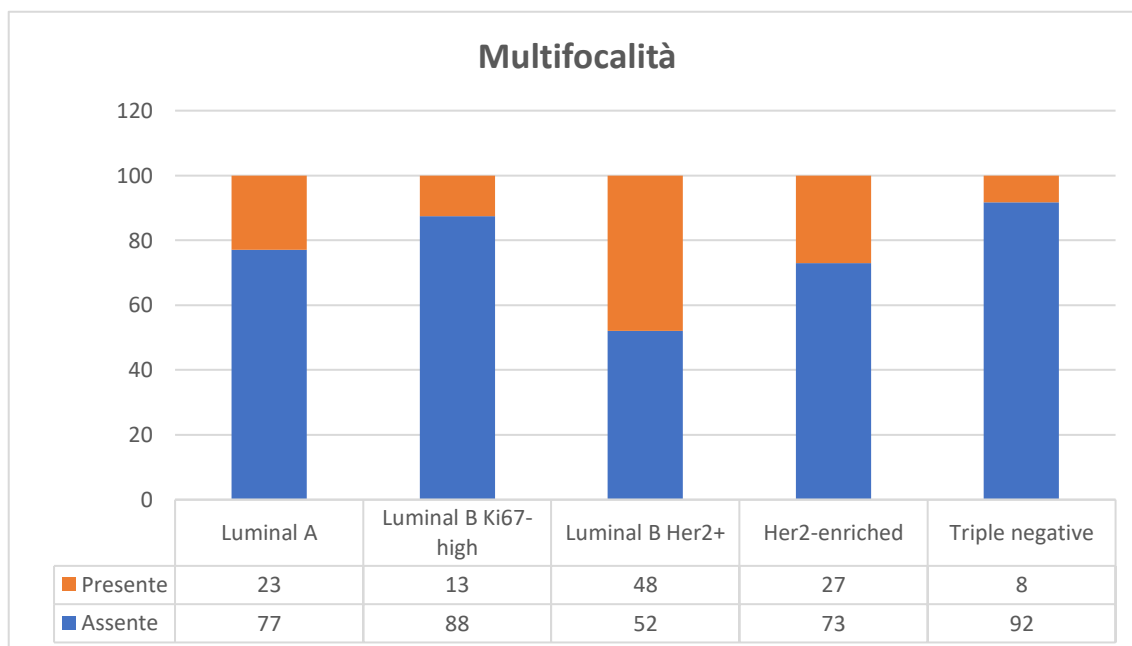
**Grafico 4.5** – Distribuzione delle percentuali di invasione vascolare angiolinfatica nei gruppi immunofenotipici.



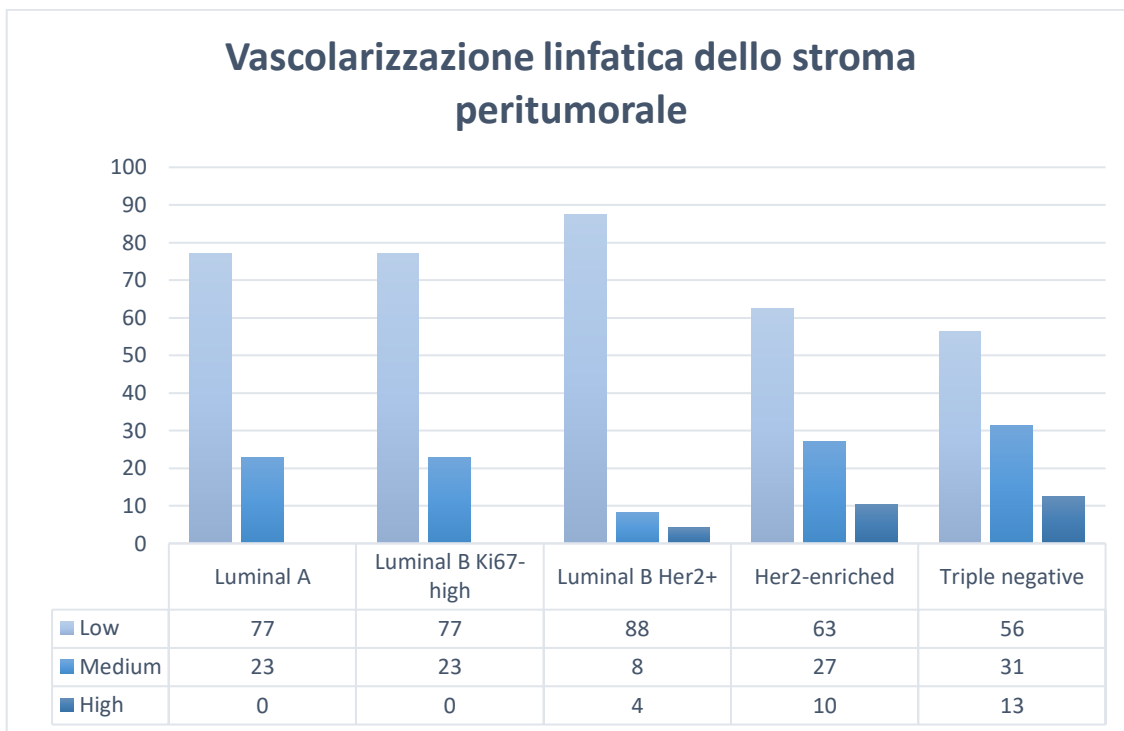
**Grafico 4.6** – Distribuzione delle percentuali di metastasi linfonodali nei gruppi immunofenotipici.



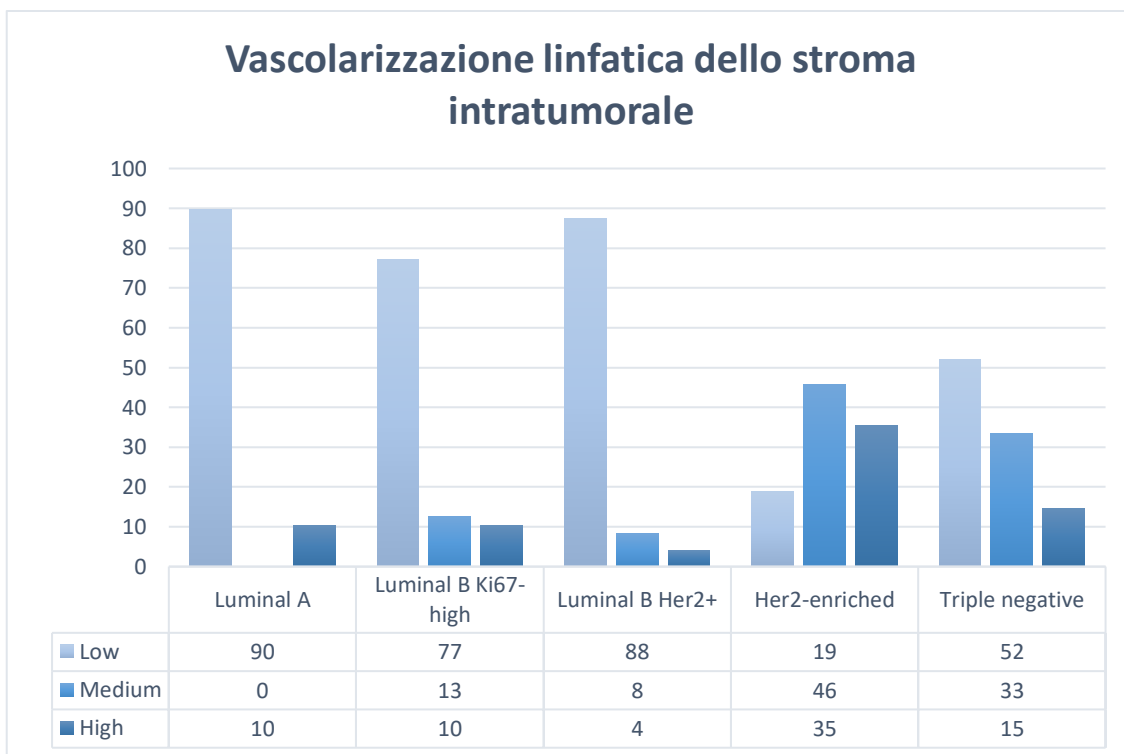
**Grafico 4.7** – Presenza di carcinoma duttale in situ associato alla neoplasia invasiva nei gruppi immunofenotipici



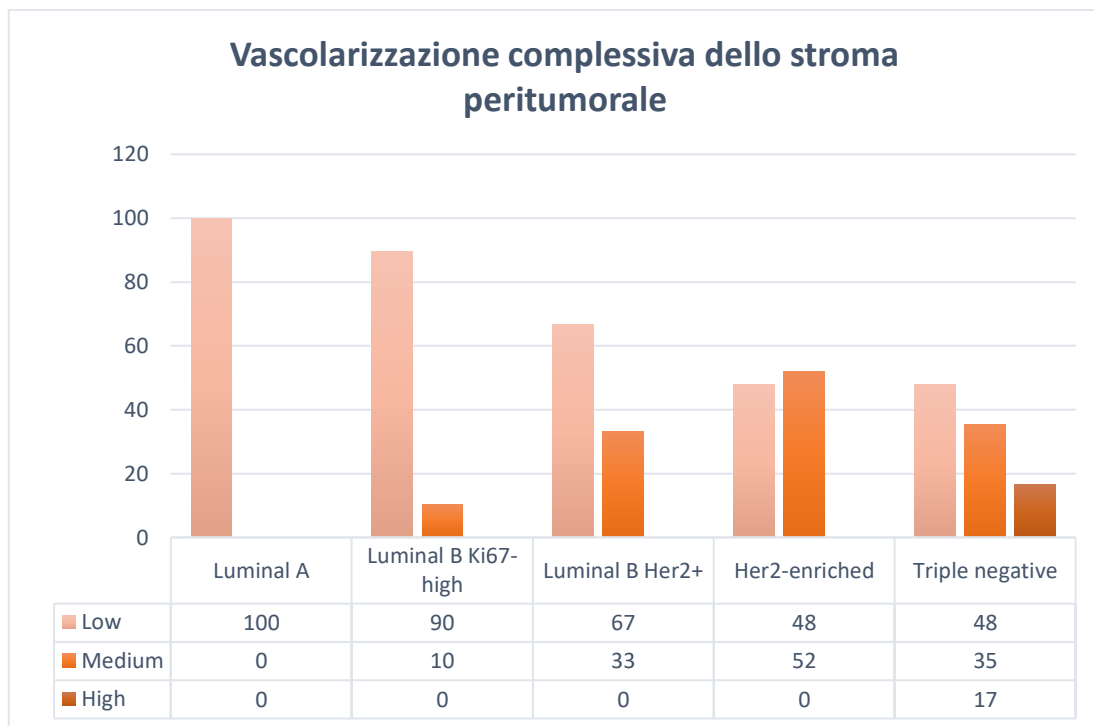
**Grafico 4.8** – Presenza di multifocalità.



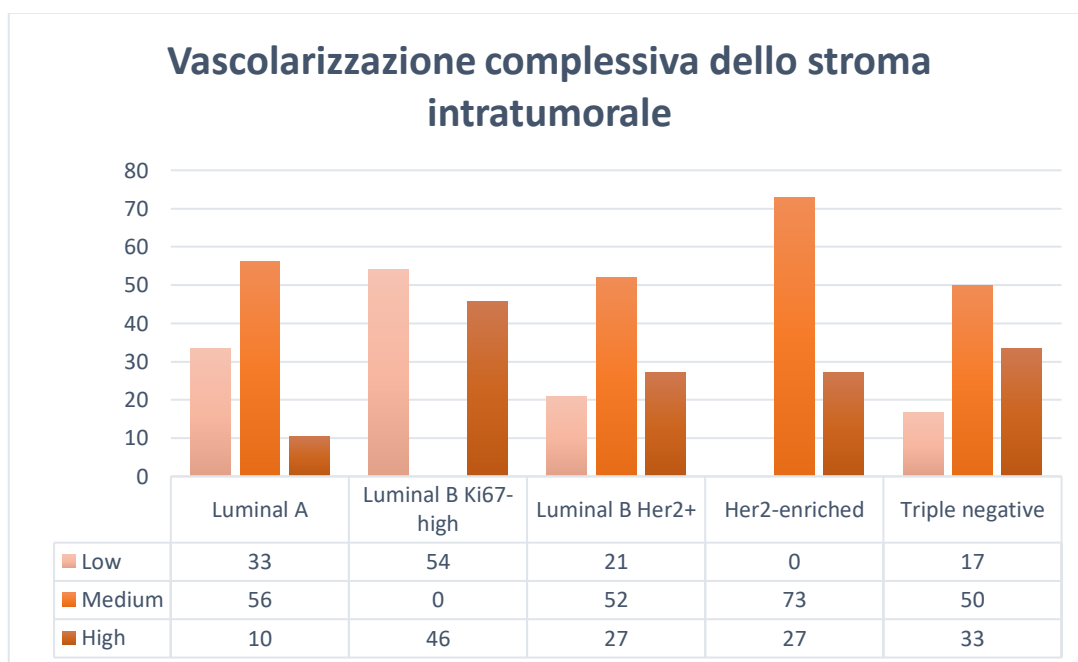
**Grafico 4.9** – Grado di vascularizzazione linfatica peritumorale valutata con il marcatore immunostochimico Podoplanina 1 (D2-40).



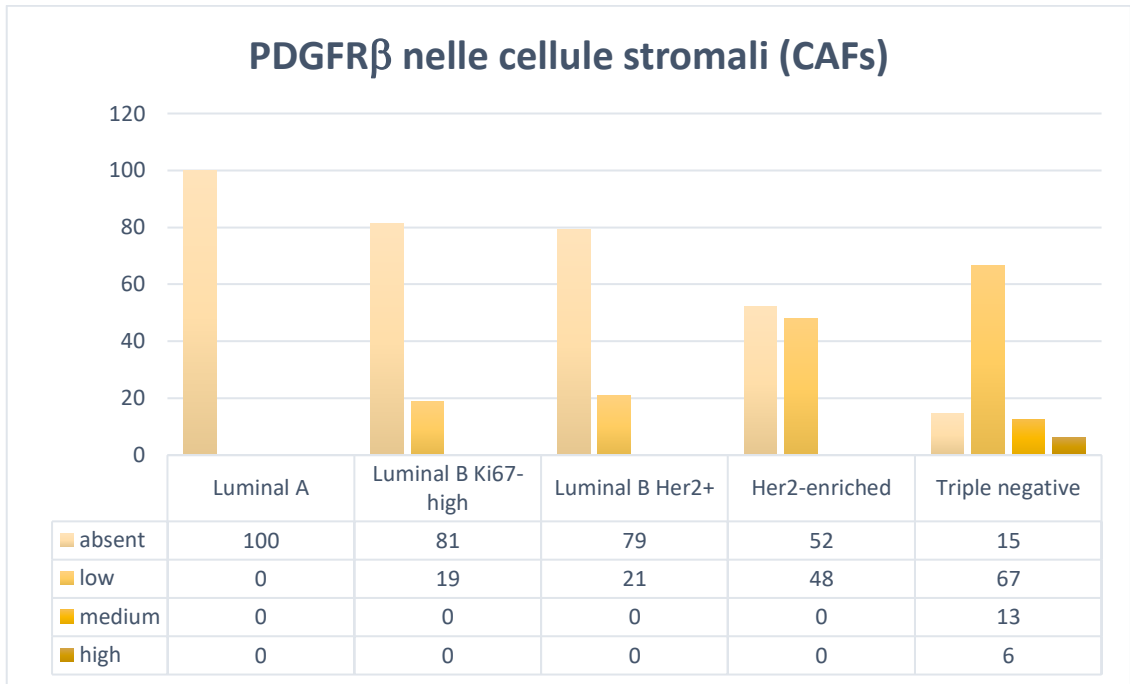
**Grafico 4.10** – Grado di vascularizzazione linfatica intratumorale valutata con il marcatore immunostochimico Podoplanina 1 (D2-40).



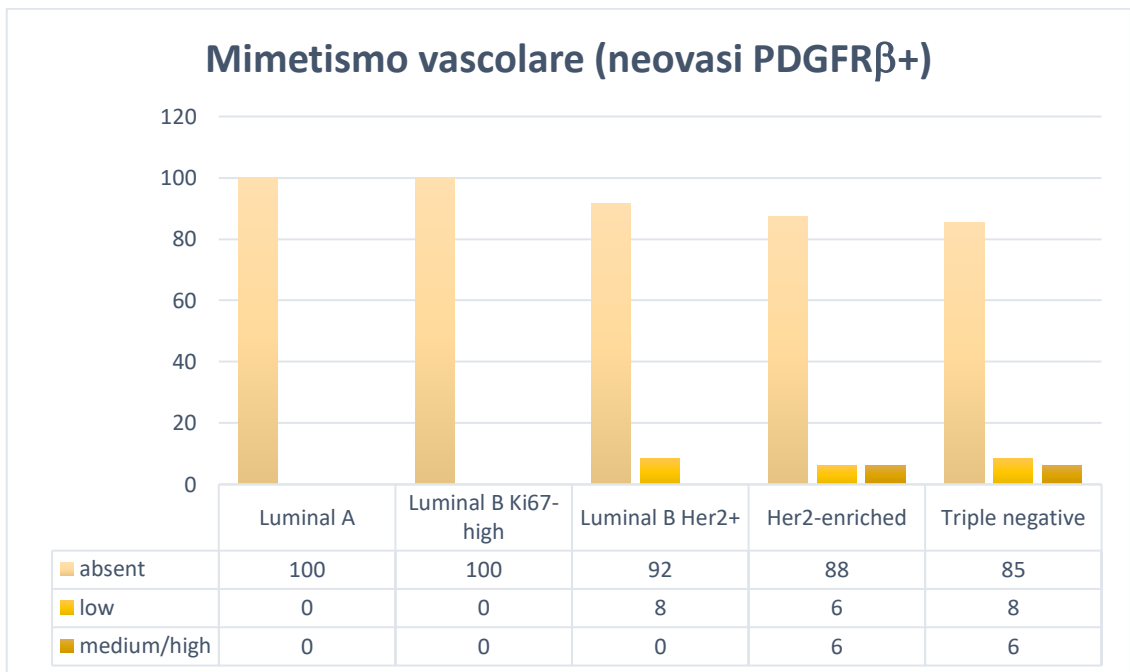
**Grafico 4.11** – Vascularizzazione complessiva dello stroma peritumorale valutata con il marcatore immunostochimico CD31.



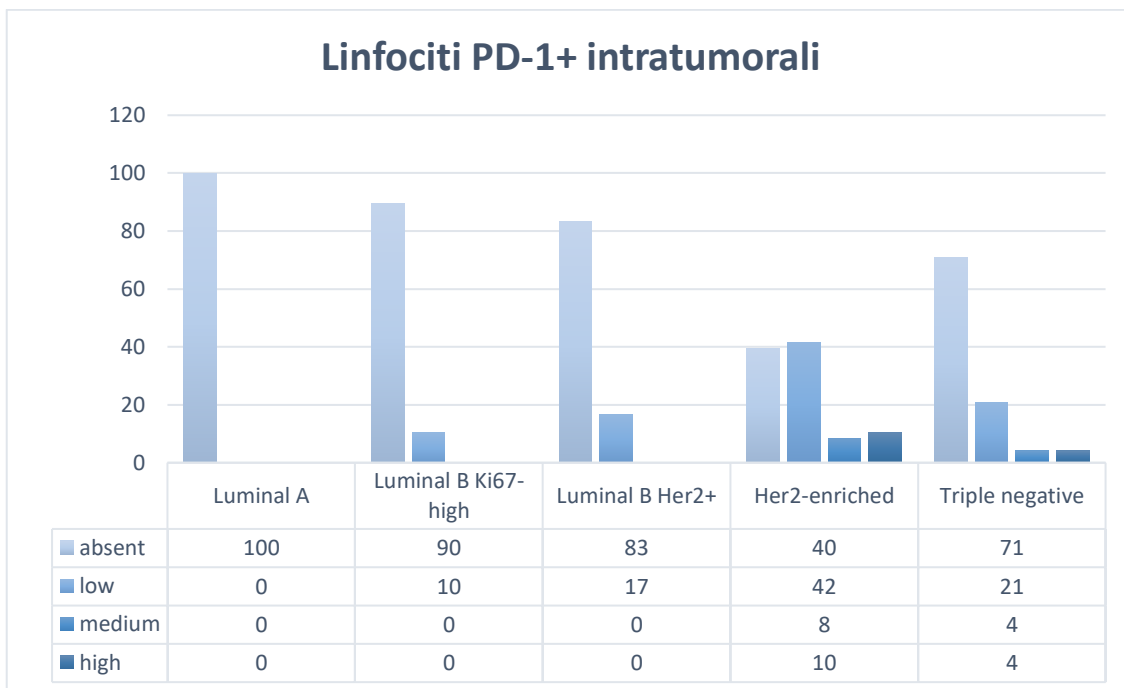
**Grafico 4.12** – Vascularizzazione intratumorale complessiva valutata con il marcatore immunostochimico CD31.



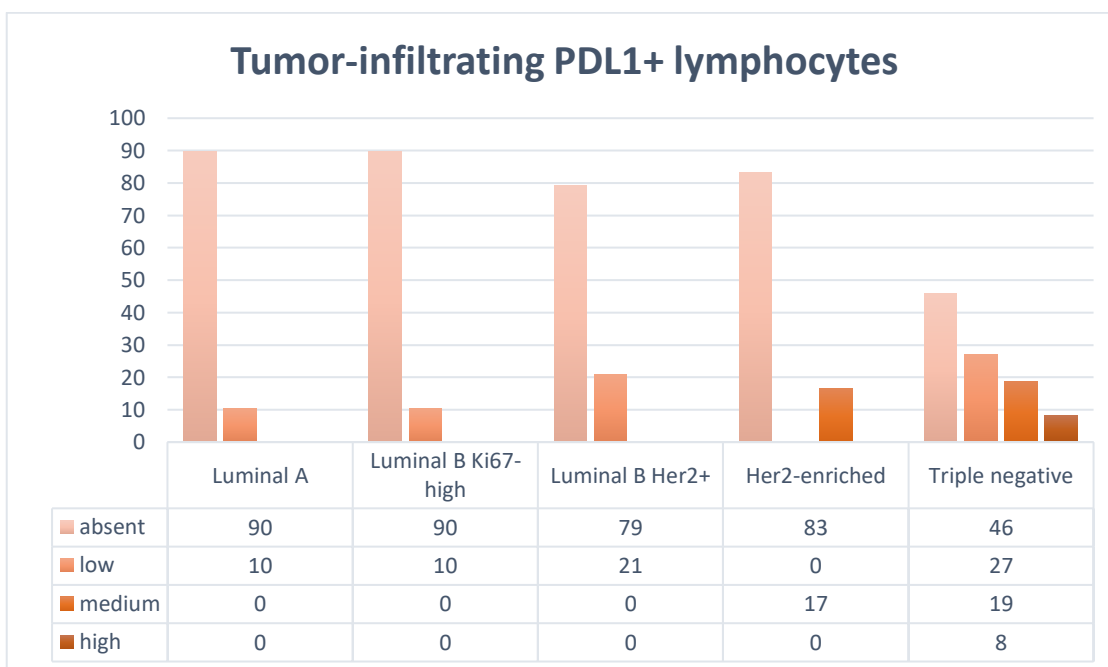
**Grafico 4.13** – Espressione di PDGFR $\beta$  nelle cellule stromali, compatibili con CAFs. I valori di intensità più elevata e sono stati riscontrati nei carcinomi triplo-negativi.



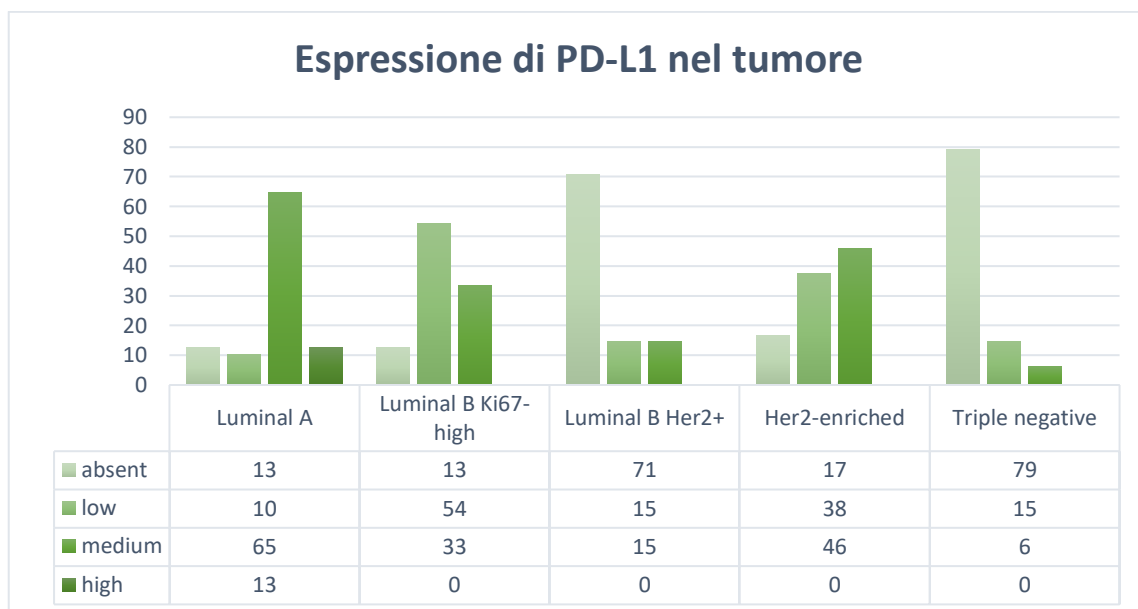
**Grafico 4.14** - Mimetismo vascolare nei quattro gruppi immunofenotipici, valutato con la colorazione immunohistochimica per PDGFR $\beta$ , che evidenziava la presenza di canali vascolari ematici bordati da cellule atipiche PDGFR $\beta$ + e CD31+.



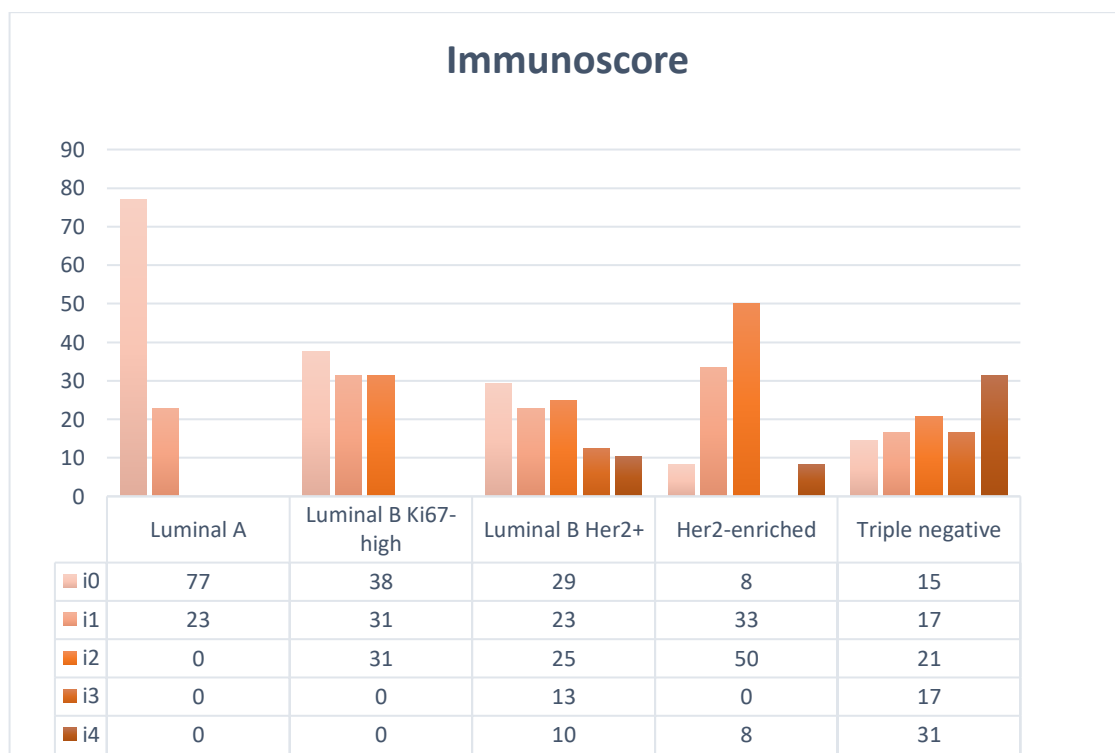
**Grafico 4.15** – Presenza di linfociti T PD-1+ a contratto con il clone neoplastico. I valori più alti sono stati riscontrati nei carcinomi Her2-enriched e nei triplo-negativi. Nei sottotipi luminal A e B non sono stati evidenziati linfociti PD-1+.



**Grafico 4.16** – Presenza di linfociti T PD-L1+ a contratto con il clone neoplastico. I valori più alti sono stati riscontrati nei carcinomi Her2-enriched e nei triplo-negativi. Nei sottotipi luminal A e B i linfociti PD-L1+ erano per lo più assenti o presenti in bassa percentuale solo in una quota minoritaria di casi

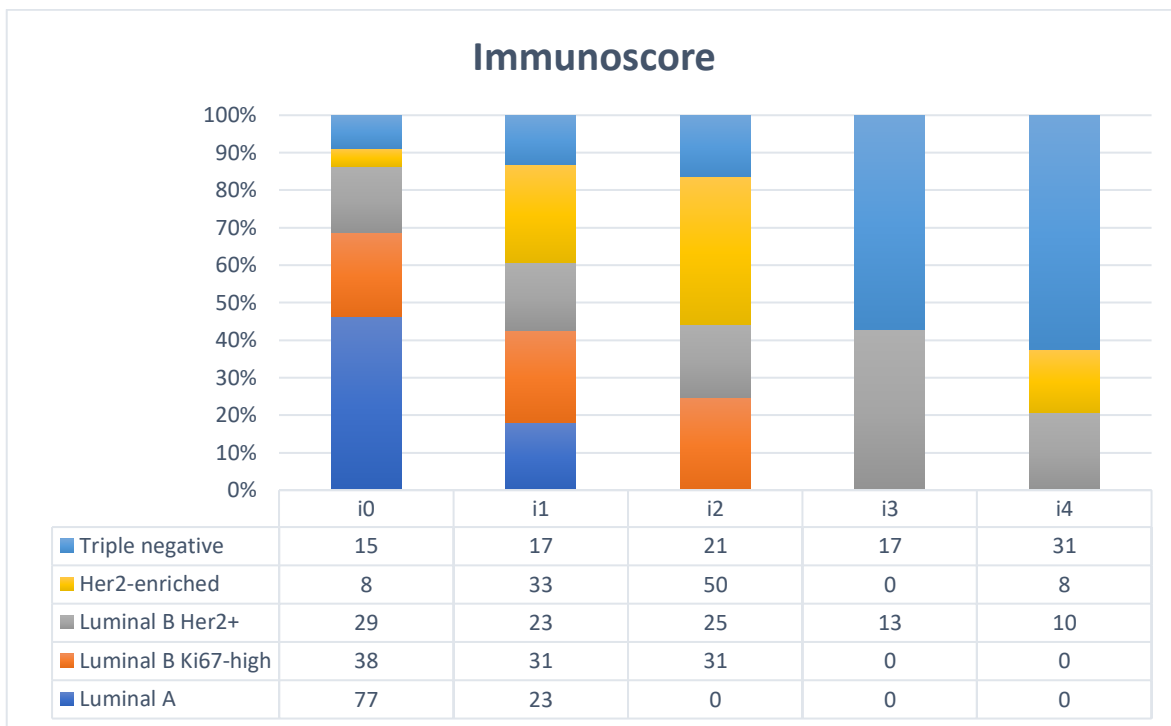


**Grafico 4.17** – Espressione immunoistochimica di PD-L1. L'intensità di espressione più elevata è stata rilevata nei carcinomi Luminal A, analogamente alla percentuale di cellule neoplastiche positive per PD-L1.

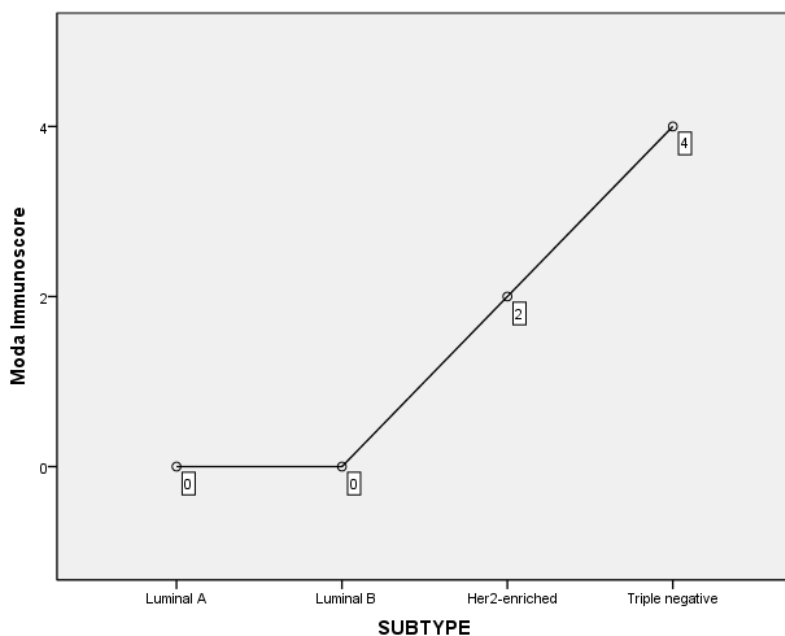


**Grafico 4.18** – Distribuzione dell'immunoscore nei quattro gruppi immunofenotipici. I valori di immunoscore più elevati sono stati riscontrati nei carcinomi triplo-negativi.

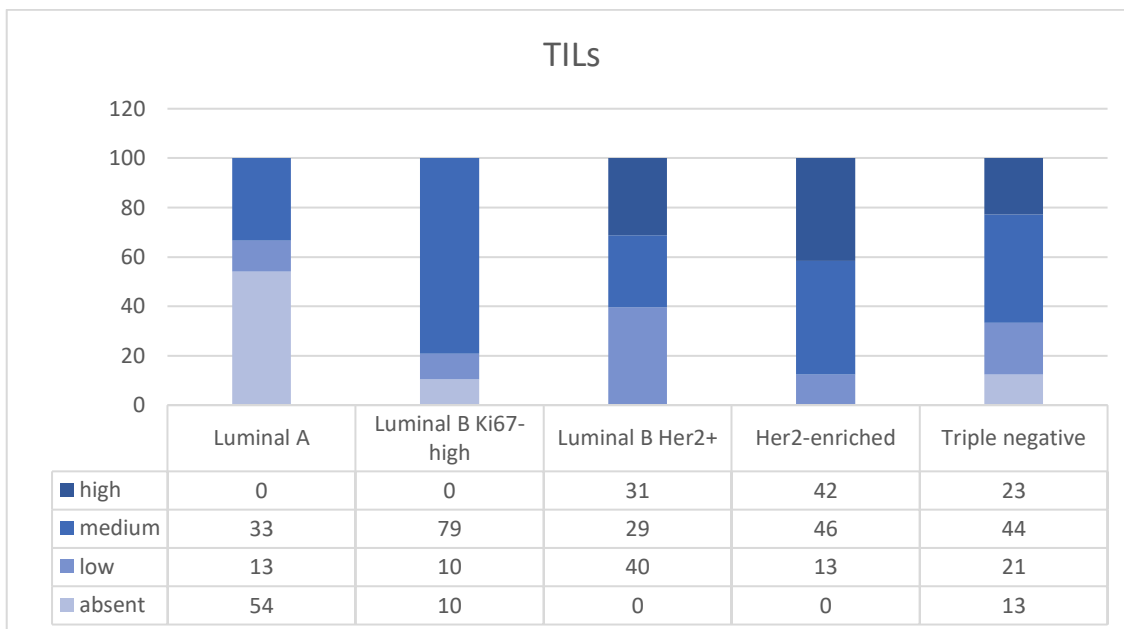




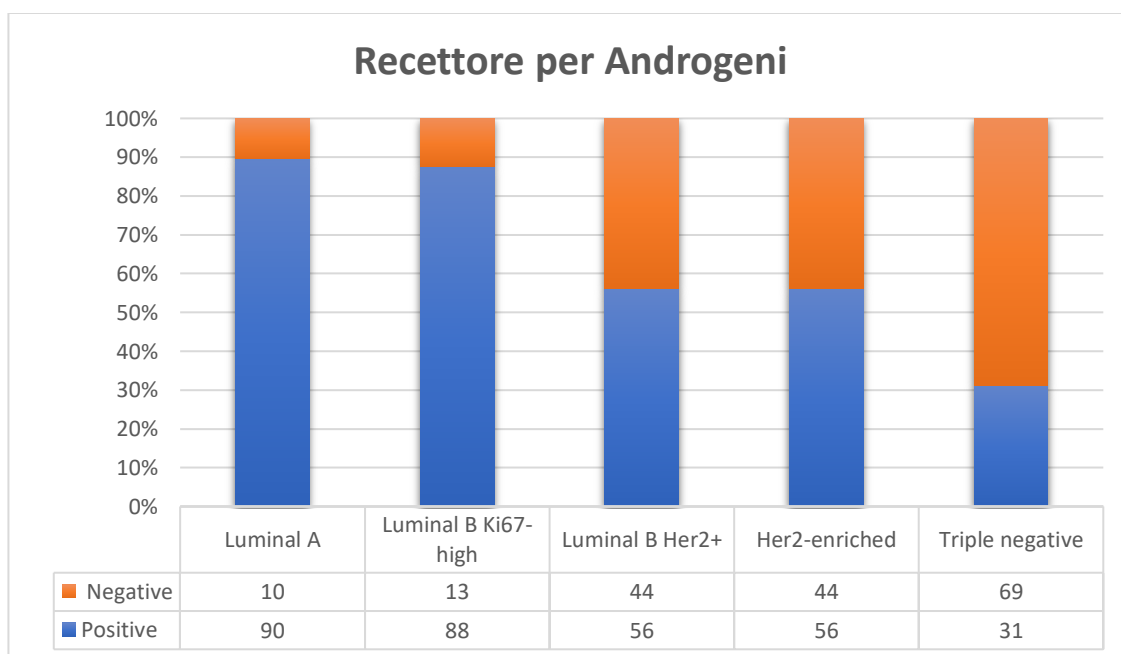
**Grafico 4.19** – Distribuzione delle classi di immunoscore nei quattro gruppi immunofenotipici. I valori di immunoscore i3 e i4 sono stati osservati nei carcinomi triplo-negativi e nei carcinomi con espressione di Her2.



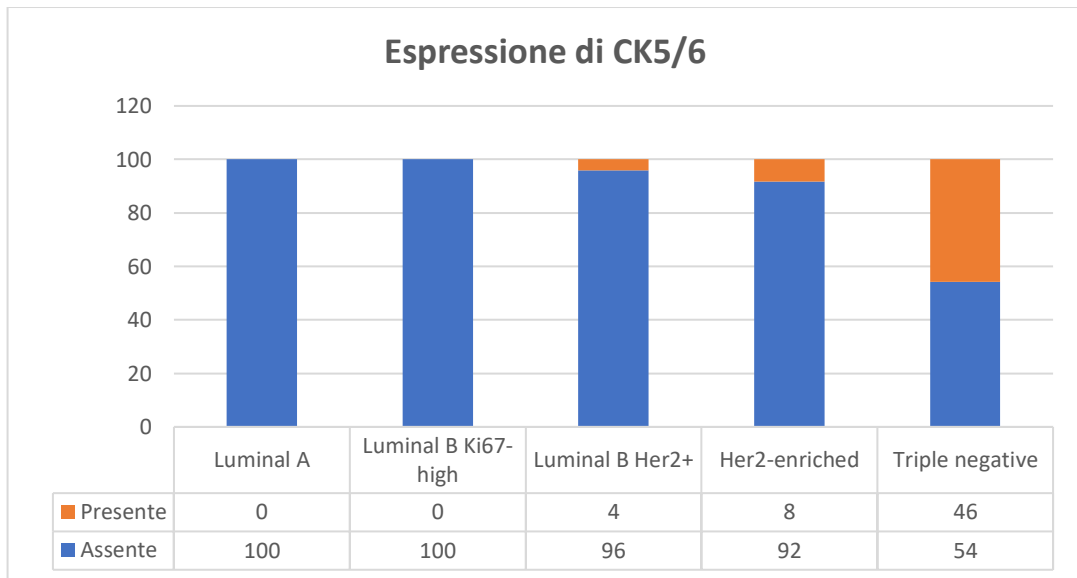
**Grafico 4.20** – Distribuzione della moda dell'immunoscore nei gruppi immunofenotipici. La classe di immunoscore più rappresentata nei carcinomi a fenotipo Luminal A e B è i0, nei carcinomi Her2 è i2, nei Triple negative i4.



**Grafico 4.21** – Distribuzione delle percentuali di TILs nei quattro gruppi immunofenotipici. Analogamente all’immunoscore, le percentuali più elevate di linfociti infiltranti il tumore, valutate solo su base morfologica, sono state riscontrate nei carcinomi triplo-negativi e in minor misura nelle forme di carcinoma Her2+ (Luminal B Her2+ e Her2-enriched).

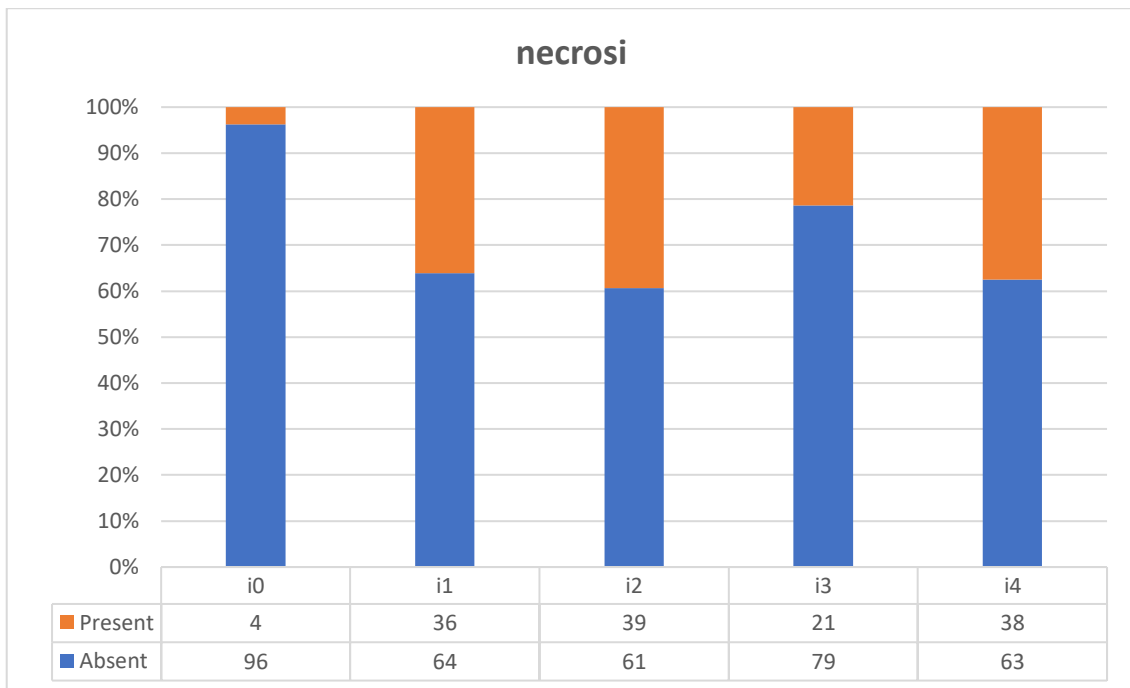


**Grafico 4.22** – Presenza di espressione del recettore androgenico nei quattro gruppi immunofenotipici.

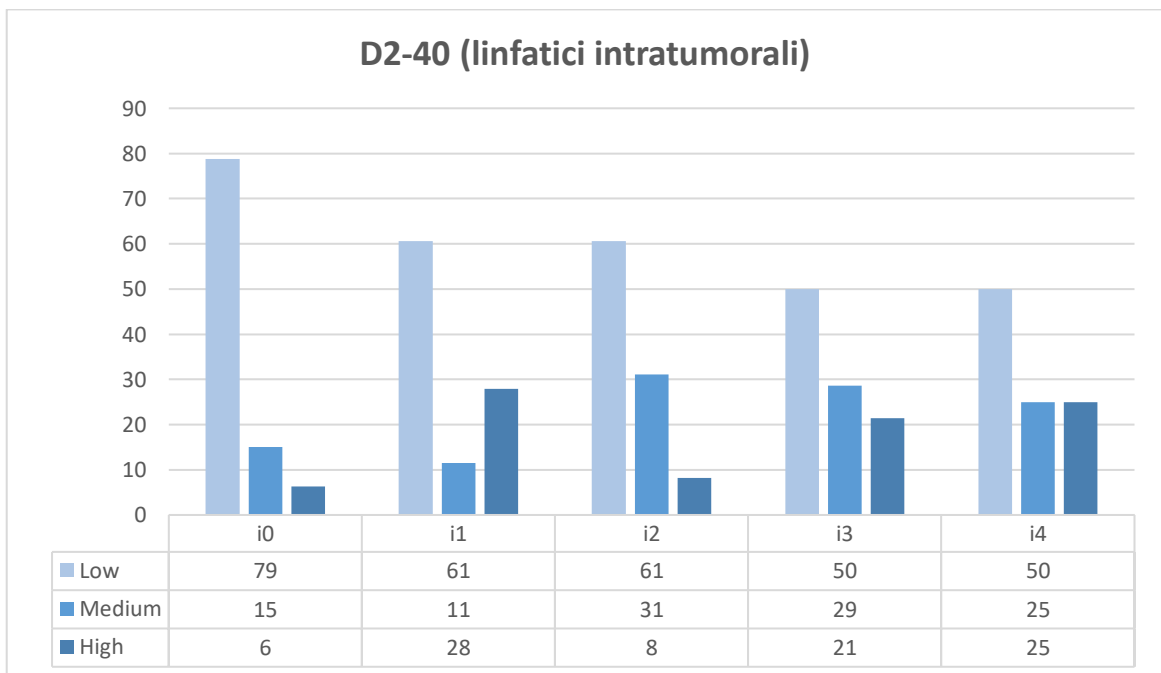


**Grafico 4.23** – Distribuzione percentuale dei carcinomi in relazione all'espressione di Citocheratine 5/6 nei quattro gruppi immunofenotipici.

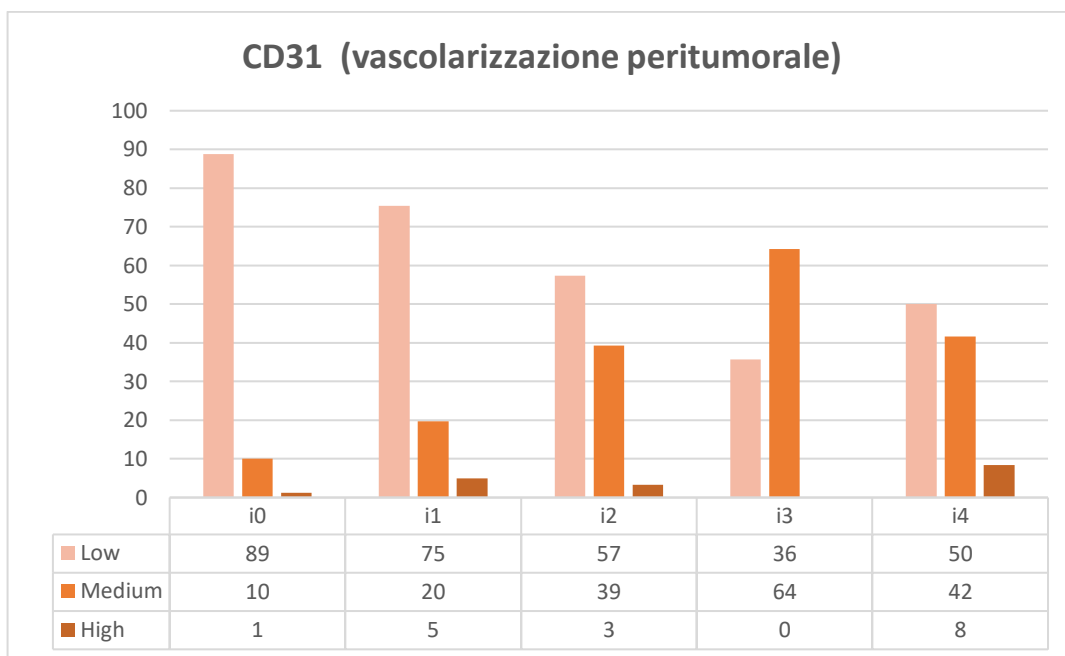
Altre rappresentazioni grafiche delle principali caratteristiche studiate in relazione alle classi di immunoscore.



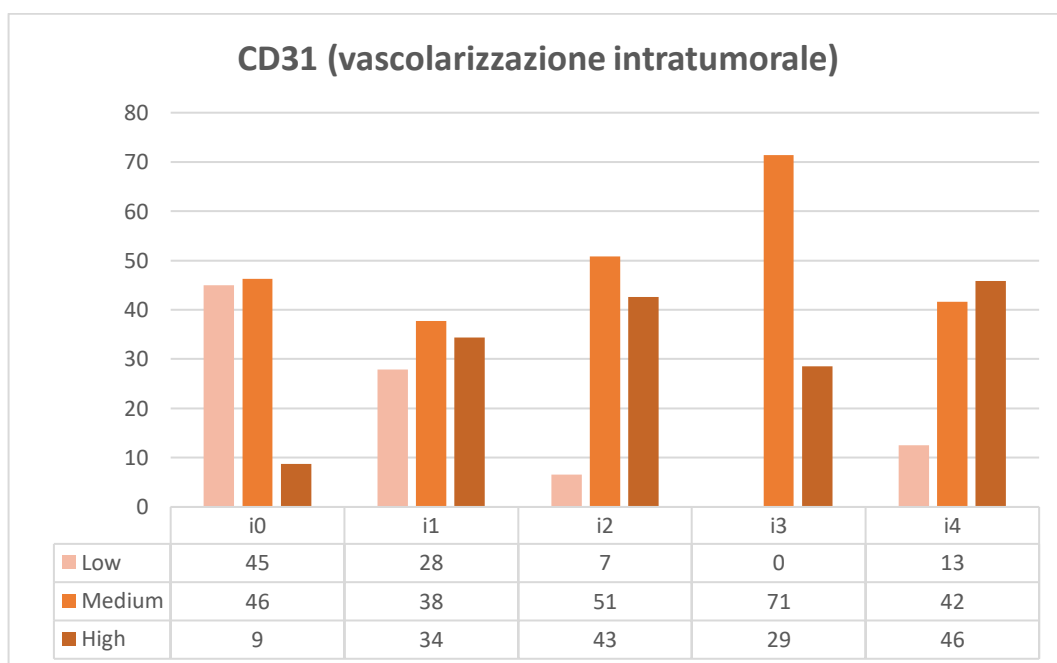
**Grafico 4.24** - Rappresentazione della presenza di necrosi tumorale in relazione all'immunoscore.



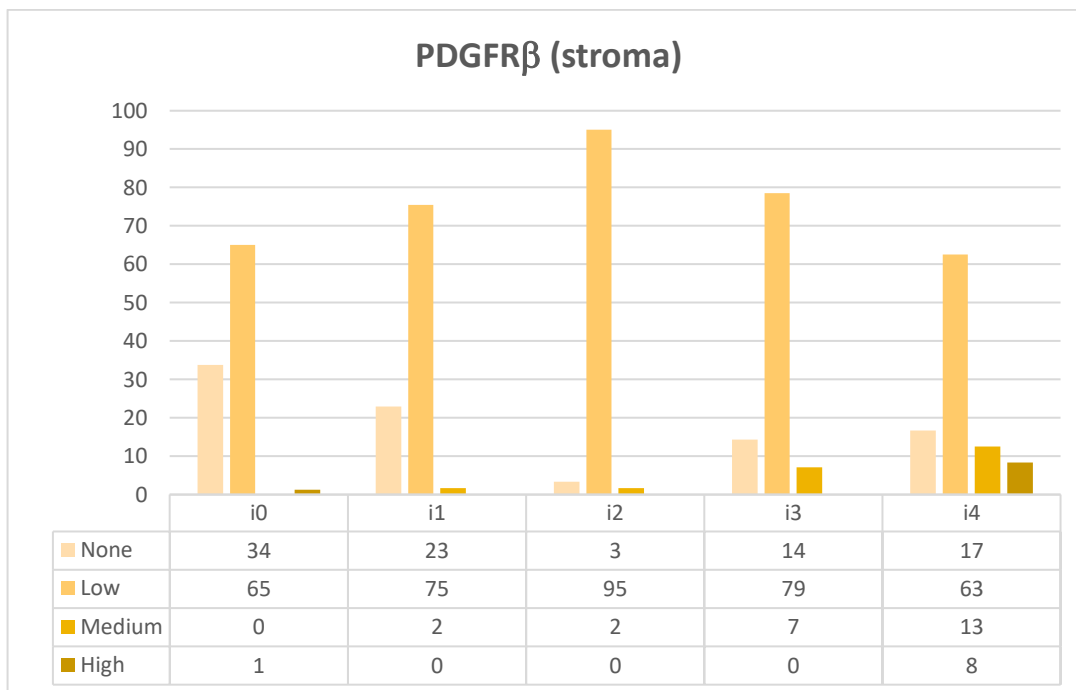
**Grafico 4.25** - Rappresentazione della vascolarizzazione linfatica dello stroma intratumorale in relazione all'immunoscore.



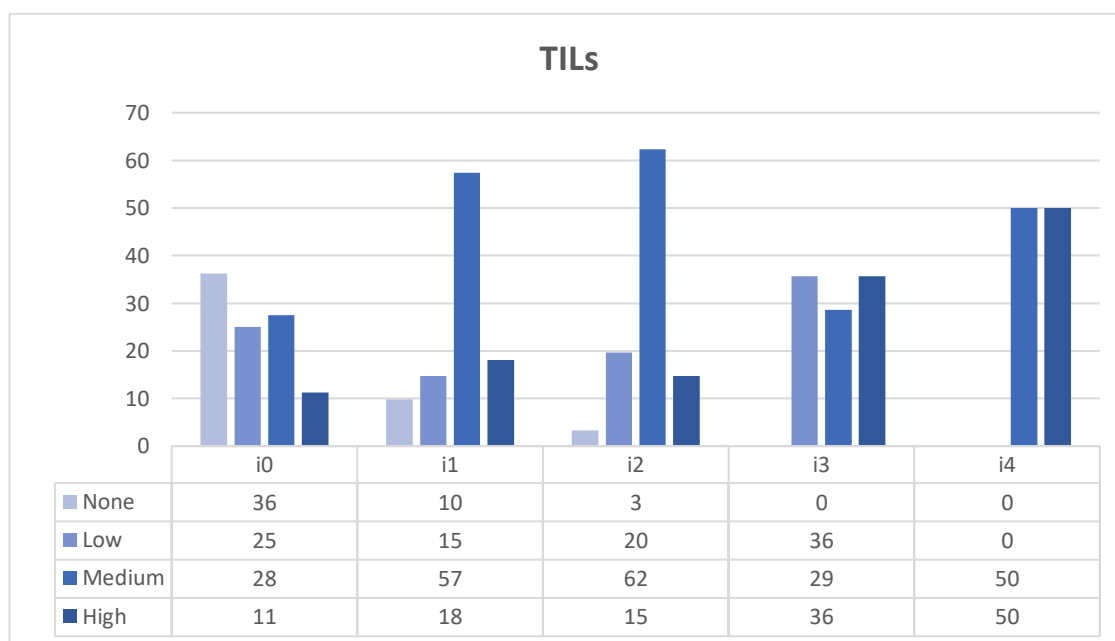
**Grafico 4.26** – Rappresentazione della vascolarizzazione complessiva dello stroma peritumorale in relazione all’immunoscore.



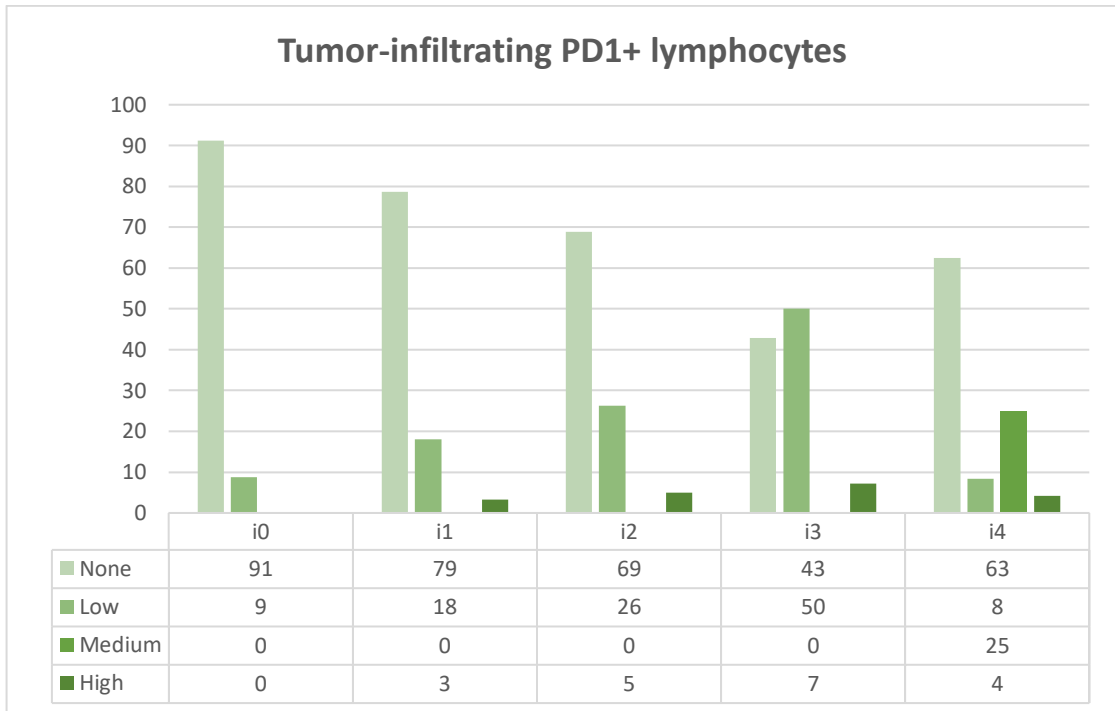
**Grafico 4.27** – Rappresentazione della vascolarizzazione complessiva dello stroma intratumorale in relazione all’immunoscore..



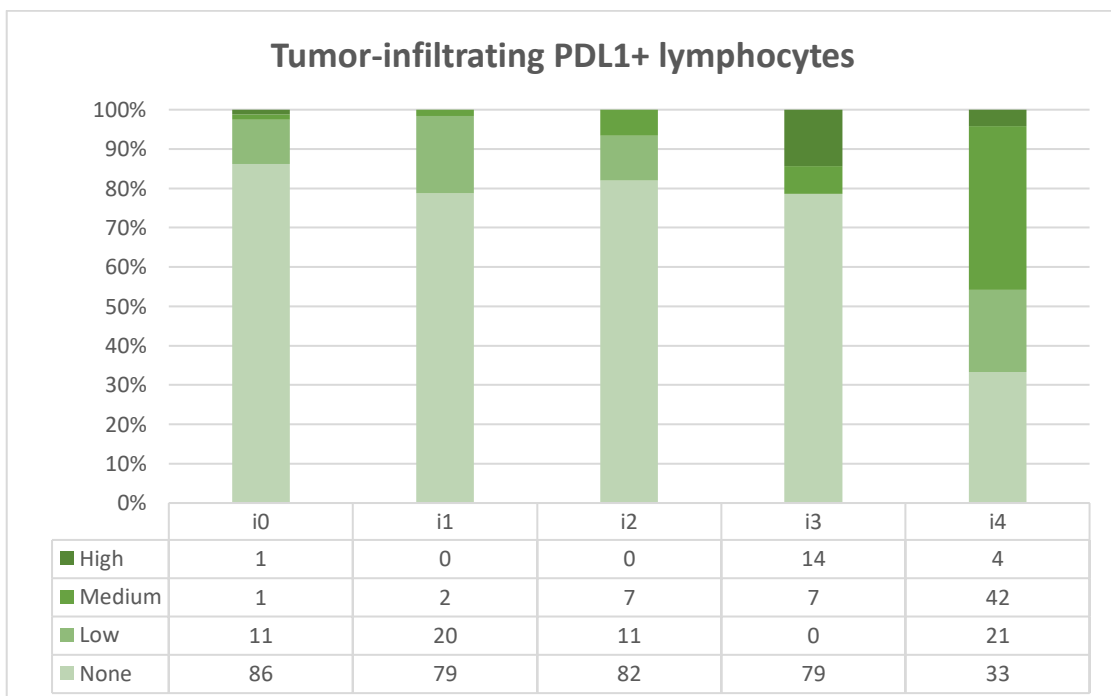
**Grafico 4.28** – Espressione di PDGFR $\beta$  nel neostroma tumorale in funzione dell’immunoscore. I valori più elevati di espressione, in termini di distribuzione e intensità, sono stati riscontrati nei carcinomi con immunoscore più elevati e che nella stragrande maggioranza dei casi mostravano un fenotipo triplo-negativo.



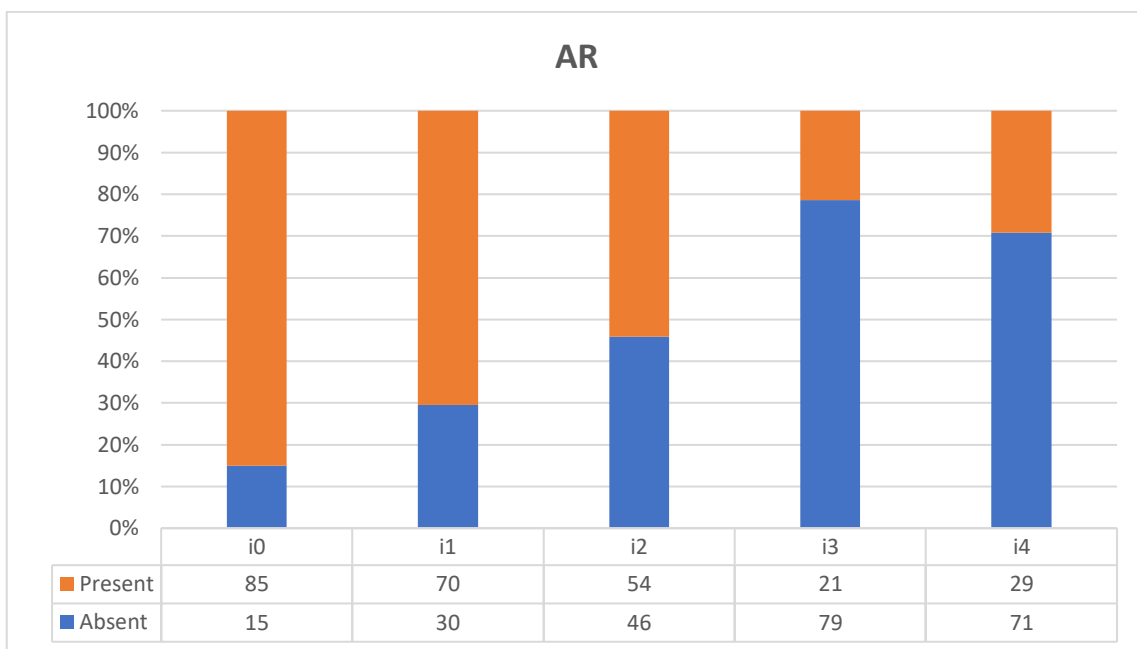
**Grafico 4.29** Percentuali di TILs.stromali valutati morfologicamente nelle classi di immunoscore.



**Grafico 4.30** – I linfociti PD-1+ risultavano più rappresentati nei carcinomi con immunoscore più elevati; tali carcinomi risultavano avere più frequentemente un fenotipo HER2-enriched e triplo-negativo.

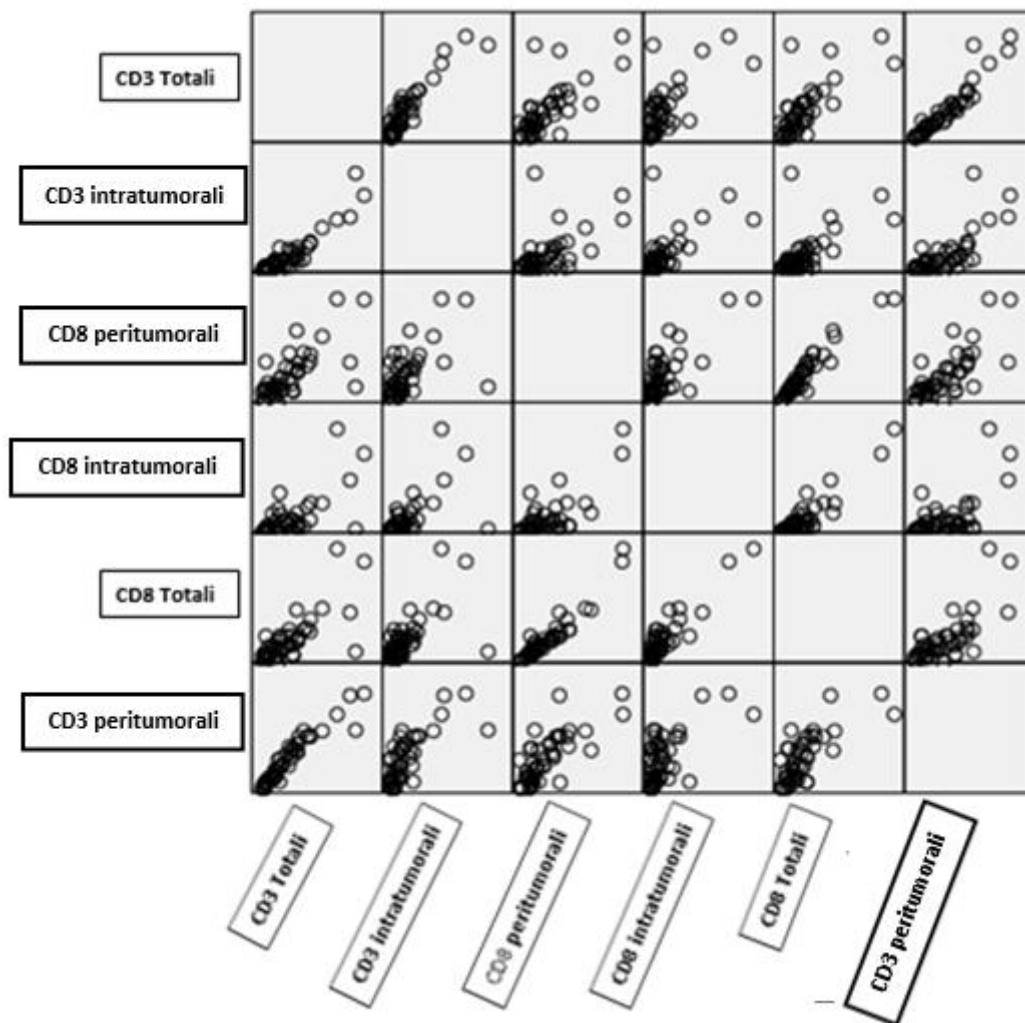


**Grafico 4.31** – I linfociti PD-L1+ risultavano più rappresentati nei carcinomi con immunoscore più elevati; tali carcinomi risultavano avere più frequentemente un fenotipo triplo-negativo.



**Grafico 4.32** – Espressione del recettore per androgeni.





**Grafico 4.33** – Matrice di dispersione per i valori di CD3 e CD8. Come controllo della consistenza dei valori di immunoscore sono state effettuate correlazioni tra i singoli valori di linfociti CD3 totali, CD8 totali, CD3 intra- e peritumorali, CD8 intra- e peritumorali.

### 4.3 Analisi statistica di correlazione

L'analisi di correlazione effettuata con il test di Spearman è stata condotta sull'intera casistica utilizzando coppie di variabili ed ha messo in luce diversi risultati significativi, che vengono riportati nella tabella.

Le variabili considerate sono state: (1) sottotipo immunofenotipico, (2) grado di differenziazione, (3) linfatici peritumorali, (4) linfatici intratumorali, (5) vascolarizzazione complessiva peritumorale, (6) vascolarizzazione complessiva intratumorale, (7) PDGFR $\beta$  nei neovasi (mimetismo vascolare), (8) PDGFR $\beta$  stromale (9) Immunoscore, (10) linfociti CD3+ intratumorali, (11) linfociti CD3+ peritumorali, (12) linfociti CD8+ intratumorali, (13) linfociti CD8+ peritumorali, (14) linfociti PD-1+ a contatto con le cellule neoplastiche, (15) linfociti PD-L1+ a contatto con le cellule neoplastiche, (16) PD-L1 nelle cellule neoplastiche, (17) Pattern di stromatogenesi, (18) TILs, (19) espressione del recettore androgenico nelle cellule neoplastiche, (20) indice di proliferazione, (21) età, (22) dimensioni della neoplasia, (23) presenza di necrosi, (24) presenza di invasione vascolare, (25) presenza di infiltrazione perineurale, (26) presenza di metastasi linfonodali, (27) necrosi tumorale, (28) multifocalità, (29) presenza di carcinoma duttale in situ associato, (30) espressione di CK 5/6 nelle cellule neoplastiche. Nella tabella 4.1 sono riportati i valori risultanti dall'analisi.

Il sottotipo (considerato come variabile ordinale prognostica) correla positivamente con l'entità della vascolarizzazione linfatica peritumorale ( $\rho = 0,197$ ;  $p = 0,002$ ) e intratumorale ( $\rho = 0,362$ ;  $p < 0,001$ ), con l'entità della vascolarizzazione complessiva peritumorale ( $\rho = 0,464$ ;  $p < 0,001$ ) e intratumorale ( $\rho = 0,218$ ;  $p = 0,001$ ), essendo progressivamente più rappresentate nei sottotipi a peggiore prognosi. Analogamente, è stata evidenziata una correlazione positiva tra sottotipo e la densità di lacune vascolari bordate da elementi PDGFR $\beta$ + ( $\rho = 0,246$ ;  $p < 0,001$ ) e tra sottotipo e l'intensità di espressione di PDGFR $\beta$  nello stroma ( $\rho = 0,375$ ;  $p < 0,001$ ).

Una correlazione negativa è stata evidenziata tra sottotipo ed espressione di PD-L1 nella componente neoplastica ( $\rho = -0,452$ ;  $p < 0,001$ ), avendo riscontrato una maggiore e intensa positività nei sottotipi a prognosi migliore.

Sono state evidenziate correlazioni positive attese (utilizzate come controllo) tra sottogruppo immunofenotipico e grading ( $\rho = 0,697$ ;  $p < 0,001$ ), dimensioni della neoplasia ( $\rho = 0,233$ ;  $p < 0,001$ ), presenza di necrosi ( $\rho = 0,514$ ;  $p < 0,001$ ), indice di proliferazione ( $\rho = 0,694$ ;  $p < 0,001$ ) ed espressione di CK5/6 nelle cellule neoplastiche ( $\rho = 0,444$ ;  $p < 0,001$ ).

Di particolare rilievo, una correlazione positiva è stata riscontrata tra sottotipo e immunoscore ( $\rho = 0,554$ ;  $p < 0,01$ ) e tra sottotipo e TILs ( $\rho = 0,362$ ;  $p < 0,01$ ); i valori più elevati sono stati riscontrati nel sottotipo triplo-negativo [Grafici 4.18, 4.19, 4.20].

L'immunoscore correla positivamente con la presenza di necrosi intratumorale ( $\rho = 0,290$ ;  $p < 0,001$ ) [Grafico 4.24], con l'entità della vascolarizzazione linfatica dello stroma intratumorale ( $\rho = 0,198$ ;  $p < 0,001$ ) [Grafico 2.25], con l'entità della vascolarizzazione complessiva dello stroma peritumorale ( $\rho = 0,346$ ;  $p < 0,001$ ) [Grafico 2.26], con l'entità della vascolarizzazione complessiva dello stroma intratumorale ( $\rho = 0,394$ ;  $p < 0,001$ ) [Grafico 2.27] e con l'intensità di espressione di PDGFR $\beta$  nello stroma ( $\rho = 0,288$ ;  $p < 0,001$ ) [Grafico 2.28]. Una correlazione positiva è stata riscontrata inoltre tra il valore dell'immunoscore e la densità di TILs ( $\rho = 0,412$ ;  $p < 0,001$ ) [Grafico 2.29], tra immunoscore e la densità di linfociti PD-1+ a contratto con il clone neoplastico ( $\rho = 0,306$ ;  $p < 0,001$ ) [Grafico 2.30] e tra immunoscore e densità di linfociti PD-L1+ intratumorali ( $\rho = 0,259$ ;  $p < 0,001$ ) [Grafico 2.31].

#### **4.4 Studio dell'espressione del recettore per androgeni nei carcinomi triplo-negativi.**

Nell'ambito dei carcinomi triplo-negativi è stato interessante lo studio del recettore androgenico. L'espressione di AR, pari a circa il 90% e 88% dei casi, rispettivamente, nei carcinomi luminali A e B, si riduce al 56% nei carcinomi luminali B HER2+ e nei carcinomi HER2+, fino a ridursi ulteriormente al 31% nei carcinomi triplo-negativi [Grafici 4.22 e 4.34].

##### Carcinomi triplo-negativi AR+

L'età media delle pazienti era di 70,5 anni (range 24-92 anni).

Le dimensioni medie del nodulo neoplastico erano di 1,4 cm (0,7-2,5 cm).

Il 67% dei carcinomi mostrava un grado G3, il 33% un grado G2 [Grafico 4.35].

Nel 13% dei casi è stata osservata la presenza di necrosi tumorale [Grafico 4.36].

Nel 20% dei casi era presente invasione vascolare e nel 7% si osservavano metastasi linfonodali.

Nel 7% dei carcinomi Triple-negative AR+ è stata evidenziata la presenza di infiltrazione perineurale. Nel 47% coesistevano aree di carcinoma duttale in situ associato al carcinoma invasivo. Nel 20% dei casi la neoplasia mostrava distribuzione bi- o multifocale.

La percentuale media di cellule proliferanti valutata con la colorazione immunoistochimica per Ki67 era del 28% (range 5-75%) [Grafici 4.37, 4.38].

La vascolarizzazione linfatica peritumorale, valutata con la Podoplanina 1 (D2-40), risultava lievemente aumentata nel 53%, moderatamente aumentata nel 33% e marcatamente aumentata nel 14% dei casi.

La vascolarizzazione linfatica intratumorale risultava lievemente aumentata nel 54%, moderatamente aumentata nel 33% e marcatamente aumentata nel 13% dei casi.

La vascolarizzazione complessiva peritumorale, valutata con CD31, mostrava un incremento lieve nel 53%, moderato nel 33% e marcato nel 14% dei casi.

La vascolarizzazione complessiva intratumorale mostrava una densità lieve nel 20%, moderato nel 67% e marcato nel 13% dei casi.

Nei casi di carcinoma triple-negative AR+ è stata rilevata una immunoreattività stromale per PDGFR $\beta$  lieve nel 60%, moderata nel 7% e intensa nel 13% dei casi; nel 20% dei casi di carcinoma triplo-negativo AR+ non erano presenti cellule stromali PDGFR.

Nel 7% dei casi sono stati riscontrati occasionali neovasi bordati da cellule neoplastiche lievemente reattive per PDGFR $\beta$ ; nel 7% dei casi è stata riscontrata una discreta densità di neovasi bordati da cellule neoplastiche reattive per PDGFR $\beta$ .

L'immunoscore risultava i0 nel 20%, i1 nel 13%, i2 nel 33%, i3 nel 20% e i4 nel 13% dei casi [Grafico 4.39].

Nell'80% dei Triple negative AR+ non erano presenti linfociti PD-1+ a contatto con il tumore; il 13% dei casi mostrava rari linfociti PD-1+ a contatto con le cellule carcinomatose, nel 7% sono stati riscontrate percentuali elevate di linfociti PD-1+.

Sono stati osservati bassi livelli di linfociti intratumorali PD-L1+ nel 7%, livelli intermedi nel 7% ed elevati nel 7% dei casi, il restante 79% dei casi non mostrava linfociti PD-L1+. Per quanto riguarda l'espressione di PD-L1 nella componente neoplastica, questa risultava negativa nel 67% dei casi. È stata riscontrata una positività lieve nel 27%, e moderata nel 7% [Grafico 4.40].

I TILs stromali valutati su base morfologica nelle sezioni in ematossilina/eosina risultavano assenti nel 20% dei casi, erano presenti in bassa percentuale nel 33%, in percentuale intermedia nel 33% e in percentuale elevata nel 14% dei casi [Grafico 4.41].

Il 13% dei casi mostrava positività per le Citocheratine 5/6 nelle cellule neoplastiche [Grafico 4.42].

#### Carcinomi triplo-negativi AR-

L'età media delle pazienti era di 55,5 anni (range 28-86 anni).

Le dimensioni medie del nodulo neoplastico erano di 3,5 cm (0,5-13 cm).

Il 91% dei carcinomi mostrava un grado G3, il 9% un grado G2 [Grafico 4.35].

Nel 55% dei casi è stata osservata la presenza di necrosi tumorale [Grafico 4.36].

Nel 27% dei casi era presente invasione vascolare e nel 15% si osservavano metastasi linfonodali.

Nel 12% dei carcinomi Triple-negative AR- è stata evidenziata la presenza di infiltrazione perineurale. Nel 27% coesistevano aree di carcinoma duttale in situ associato al carcinoma invasivo. Nel 3% dei casi la neoplasia mostrava distribuzione bi- o multifocale. La percentuale media di cellule proliferanti valutata con la colorazione immunoistochimica per Ki67 era del 62% (range 12-98%) [Grafici 4.37, 4.38].

La vascolarizzazione linfatica peritumorale, valutata con la Podoplanina 1 (D2-40), risultava lievemente aumentata nel 56%, moderatamente aumentata nel 31% e marcatamente aumentata nel 13% dei casi.

La vascolarizzazione linfatica intratumorale risultava lievemente aumentata nel 52%, moderatamente aumentata nel 33% e marcatamente aumentata nel 15% dei casi.

La vascolarizzazione complessiva peritumorale, valutata con CD31, si presentava di grado lieve nel 45%, moderato nel 36% e marcato nel 18% dei casi.

La vascolarizzazione complessiva intratumorale si presentava di grado lieve nel 15%, moderato nel 42% e marcato nel 42% dei casi.

Nei casi di carcinoma triple-negative AR- è stata rilevata una immunoreattività stromale per PDGFR $\beta$  lieve nel 70%, moderata nel 15% e intensa nel 3% dei casi.

Nel 9% dei casi sono stati riscontrati occasionali neovasi bordati da cellule neoplastiche lievemente reattive per PDGFR $\beta$ ; nel 6% dei casi è stata riscontrata una discreta densità di neovasi bordati da cellule neoplastiche reattive per PDGFR $\beta$ .

L'immunoscore risultava i0 nel 12%, i1 nel 18%, i2 nel 15%, i3 nel 15% e i4 nel 39% dei casi [Grafico 4.39].

Nel 67% dei Triple negative AR- non erano presenti linfociti PD-1+ a contatto con il tumore. Il 24% dei casi mostrava rari linfociti PD-1+ a contatto con le cellule carcinomatose, nel 6% e nel 3% sono stati riscontrate rispettivamente percentuali intermedie ed elevate di linfociti PD-1+.

Sono stati osservati bassi livelli di linfociti intratumorali PD-L1+ nel 36%, livelli intermedi nel 24% ed elevati nel 9% dei casi, il restante 30% dei casi non mostrava linfociti PD-L1+ [Grafico 4.40].

Per quanto riguarda l'espressione di PD-L1 nella componente neoplastica, questa risultava negativa nell'85% dei casi. È stata riscontrata una positività lieve nel 9%, e moderata nel 6%.

I TILs stromali valutati su base morfologica nelle sezioni in ematossilina/eosina risultavano assenti nel 9% dei casi, erano presenti in bassa percentuale nel 15%, in percentuale intermedia nel 48% e in percentuale elevata nel 27% dei casi [Grafico 4.41]. Il 61% dei casi mostrava positività per le Citocheratine 5/6 nelle cellule neoplastiche [Grafico 4.42].

#### 4.4.3 Analisi di correlazione nei carcinomi triplo-negativi in base allo stato di AR

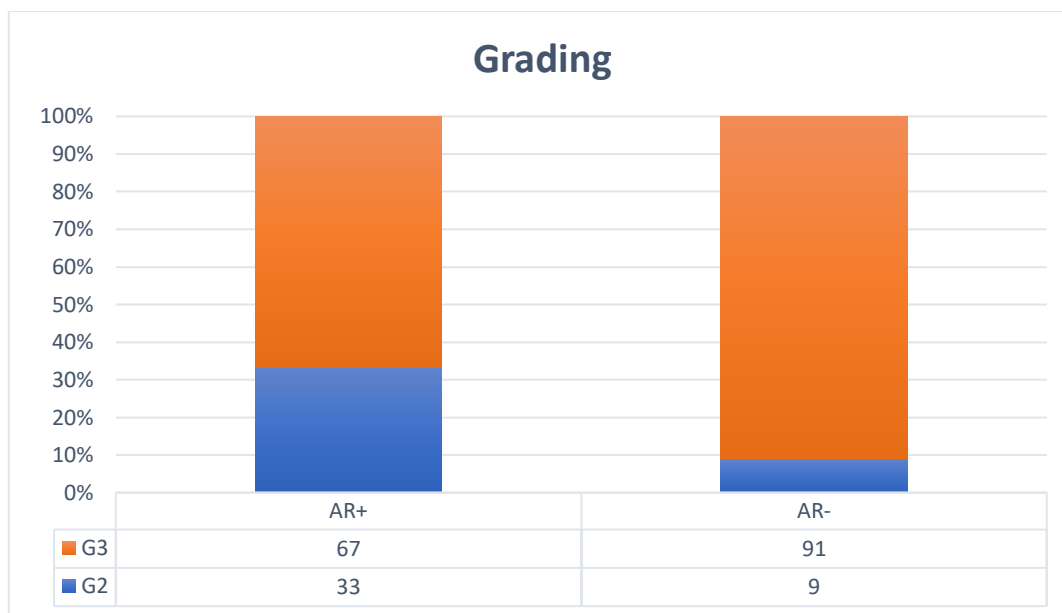
L'analisi di correlazione ha evidenziato come l'espressione di AR corredi negativamente con l'indice di proliferazione ( $\rho = -0,596$ ;  $p < 0,001$ ) [Grafico 4.38].

Sono inoltre state evidenziate correlazioni negative tra percentuale di AR e grading ( $\rho = -0,314$ ;  $p < 0,001$ ), dimensioni tumorali ( $\rho = -0,565$ ;  $p < 0,001$ ), presenza di necrosi ( $\rho = -0,427$ ;  $p < 0,001$ ), espressione di CK5/6 ( $\rho = -0,409$ ;  $p < 0,001$ ), TILs ( $\rho = -0,330$ ;  $p < 0,05$ ), linfociti intratumorali PD-L1+ ( $\rho = -0,439$ ;  $p < 0,001$ ) e valori di immunoscore ( $\rho = -0,241$ ;  $p < 0,001$ ). È stata evidenziata una correlazione positiva con l'età ( $\rho = 0,475$ ;  $p < 0,001$ ).

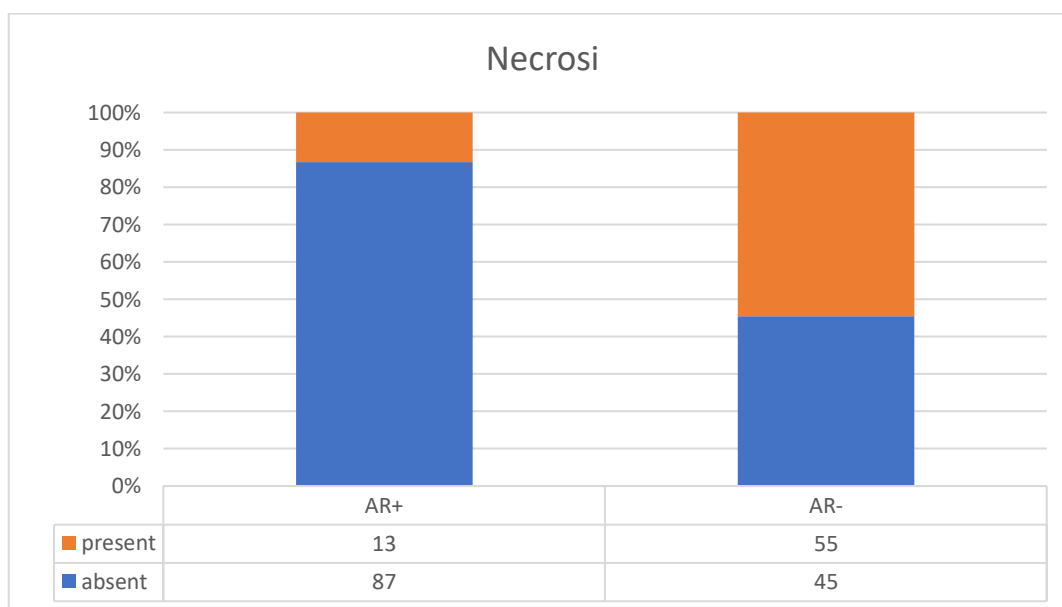
Pertanto nei carcinomi triplo-negativi l'espressione del recettore androgenico sembrerebbe essere associata a caratteristiche biologiche di minore aggressività



**Grafico 4.34** – Espressione del recettore per androgeni nei carcinomi triplo-negativi.

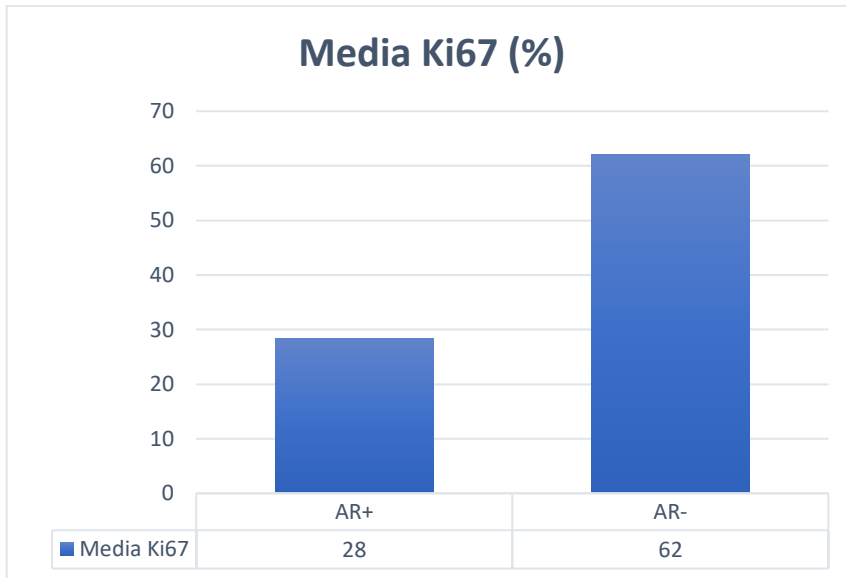


**Grafico 4.35** – Grado di differenziazione tumorale in relazione alla positività del recettore per androgeni.

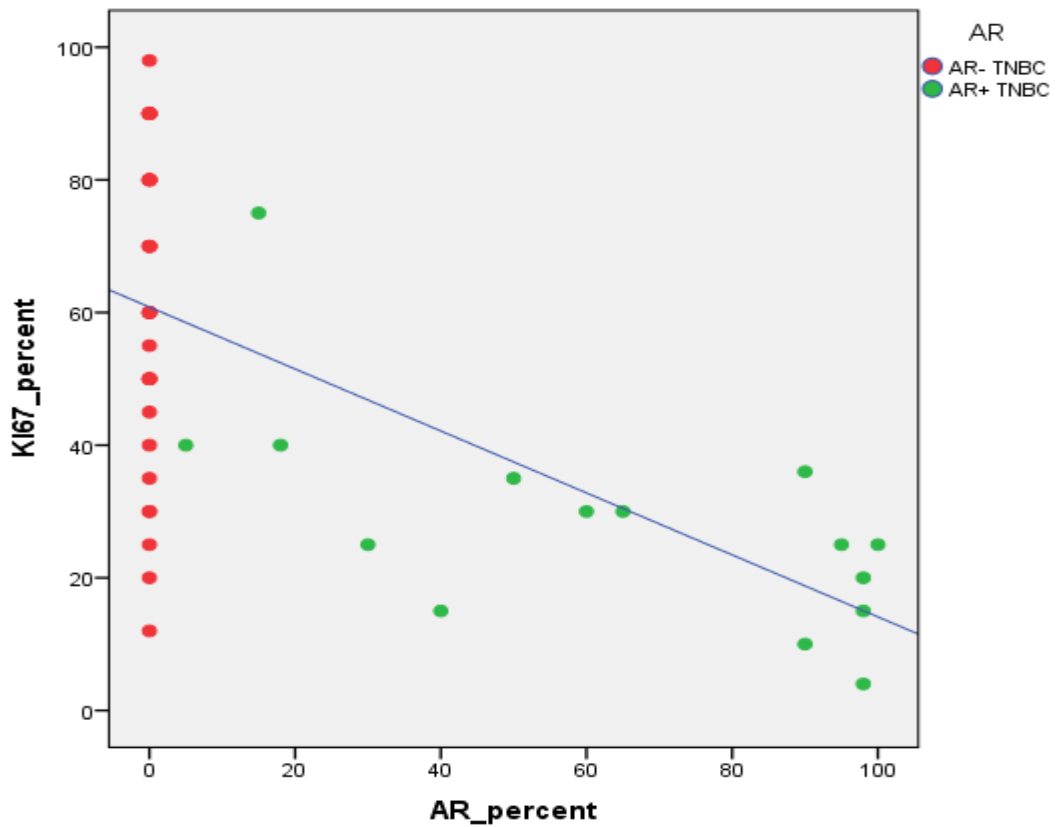


**Grafico 4.36** – Presenza di necrosi tumorale in relazione alla positività del recettore per androgeni.

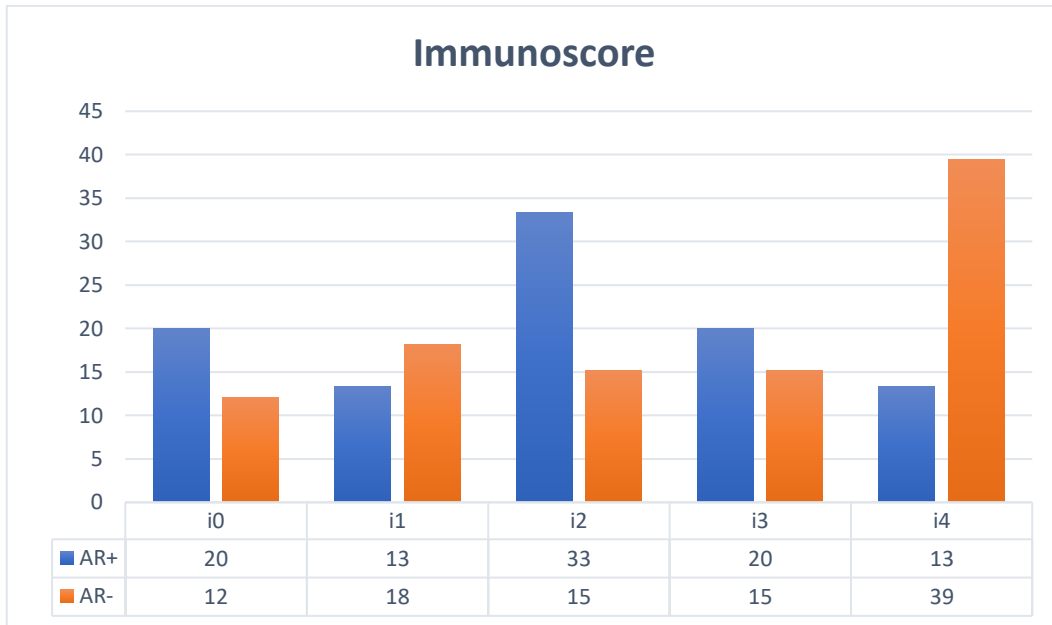




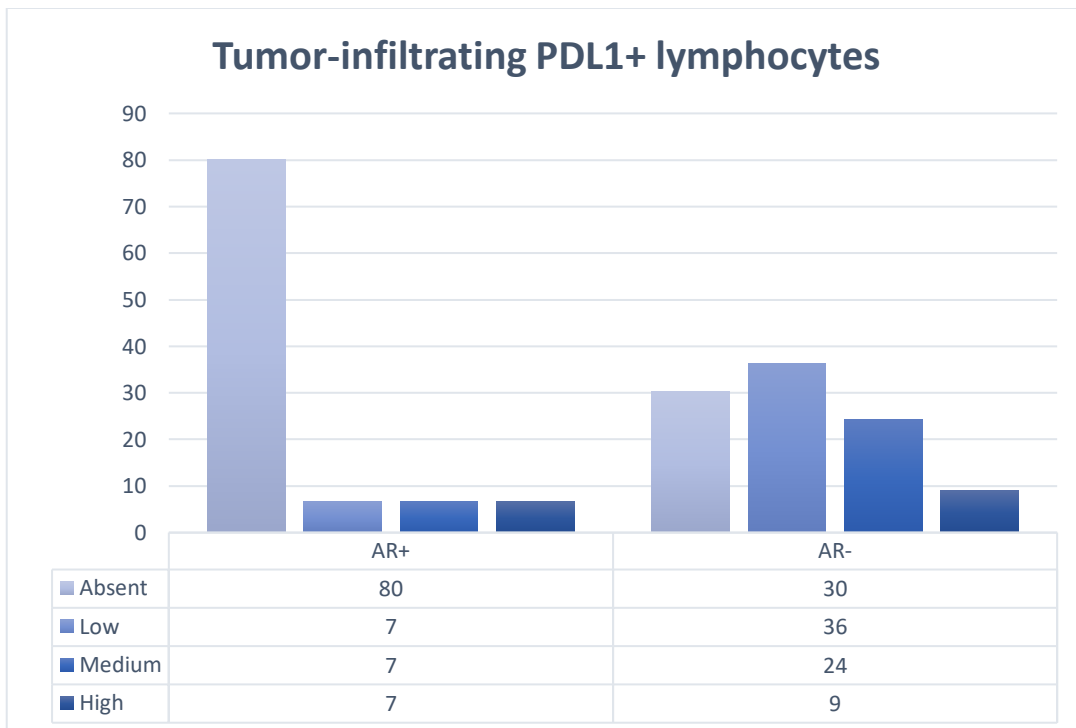
**Grafico 4.37** – Valore medio della percentuale di cellule neoplastiche proliferanti (Ki67+) nei carcinomi triplo-negativi in relazione alla positività del recettore per androgeni.



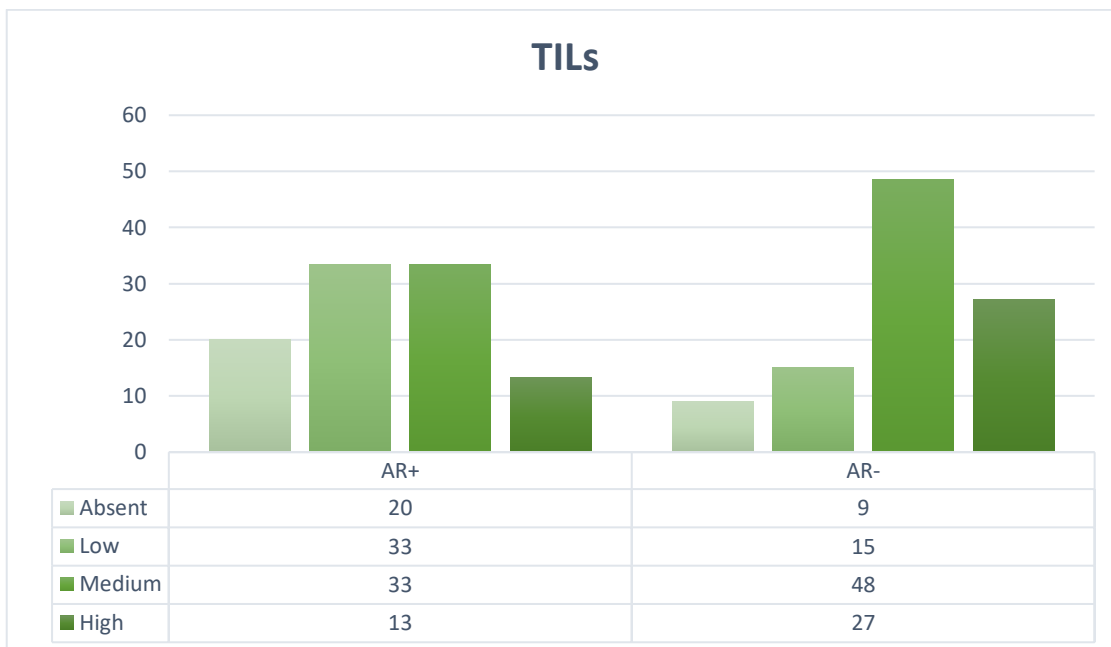
**Grafico 4.38** – Matrice di dispersione dei valori percentuali di cellule neoplastiche proliferanti (Ki67+) nei carcinomi triplo-negativi.



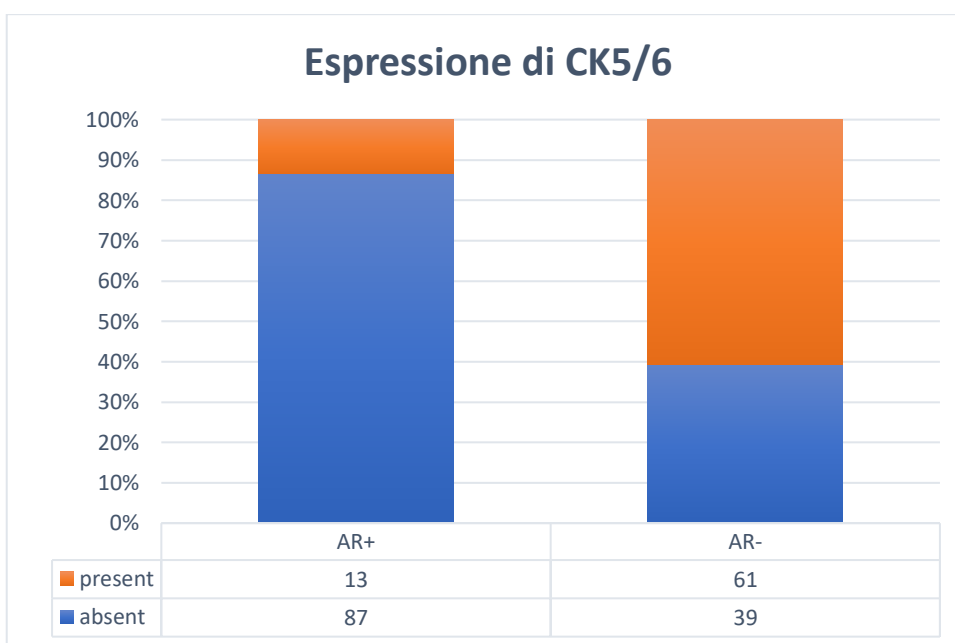
**Grafico 4.39** – Valori di immunoscore nei carcinomi triplo-negativi AR+ e AR-.



**Grafico 4.40** – Densità di linfociti PDL1+ intratumorali nei carcinomi triplo-negativi AR+ e AR-.



**Grafico 4.41** – Densità di linfociti infiltranti il tumore stromali determinata morfologicamente nei carcinomi triplo-negativi AR+ e AR-.



**Grafico 4.42** – Valori percentuali dei casi CK5/6+ nei carcinomi triplo-negativi AR+ e AR-.

## 5. DISCUSSIONE

Fino a poco tempo fa, la classificazione e la gestione dei carcinomi mammari erano basate principalmente sulle caratteristiche clinico-patologiche, incluse le dimensioni del tumore, il grado istologico e lo stato dei linfonodi.

Generalmente la chemioterapia sistemica è stata utilizzata nel trattamento di carcinomi mammari di alto grado, indipendentemente dal tipo istologico e dal profilo immunofenotipico.

Oggi, la gestione delle pazienti affette da carcinomi alla mammella è sempre più guidata dalle caratteristiche molecolari patobiologiche, tenendo sempre meno in considerazione le caratteristiche clinico-patologiche.

Pazienti con sottotipi immunofenotipici associati ad una buona prognosi, per esempio *luminal A*, possono essere risparmiate dal trattamento chemioterapico; pazienti con tumori tipo *basal-like*, con prognosi peggiore, possono ricevere beneficio da un trattamento chemioterapico sistemico, anche se di piccole dimensioni.

Inoltre, l'identificazione di aberrazioni molecolari distinte in ciascun sottotipo di carcinoma mammario potrebbe essere utile come potenziale target terapeutico. È stato dimostrato che alcuni carcinomi mammari *triple negative* (TNBCs) rispondano bene alla chemioterapia neoadiuvante, con una sopravvivenza a 5 anni superiore al 90%, mentre altri TNBCs, meno sensibili al trattamento sistemico chemioterapico, tendano ad avere un esito peggiore, con una sopravvivenza a 5 anni del 30%.

Le varie classificazioni molecolari dei carcinomi mammari tentano di spiegare le variazioni biologiche intrinseche di questi tumori e di stratificarli in gruppi clinicamente rilevanti, al di là di quelli legati alle caratteristiche esclusivamente fenotipiche dei recettori ormonali (ER e PgR) ed HER2, con l'obiettivo di poter sviluppare e utilizzare terapie mirate.

Recentemente, l'interesse della ricerca nell'ambito della patologia oncologica si è aperto quindi a nuovi approcci basati sul concetto che i carcinomi mammari (così come in altri organi) non siano costituiti solo ed esclusivamente dal "parenchima neoplastico" ma anche e soprattutto dallo stroma associato al tumore.

Su queste basi, il presente lavoro è stato finalizzato all'approfondimento del contesto stromale e immunologico associato ai carcinomi mammari.

Lo studio delle caratteristiche dello stroma neoplastico ci ha permesso di individuare quattro pattern di reazione stromale più frequenti, che tuttavia non sembrerebbero correlati alle caratteristiche morfologiche della neoplasia. In tal senso, maggiore chiarezza si potrebbe ottenere con lo studio di caratteristiche più dettagliate dello stroma, come ad esempio lo studio dei tipi di collagene o dell'espressione e distribuzione di recettori per fattori di crescita.

Dai dati ottenuti è possibile affermare che sebbene i TNBC non siano caratterizzati da un pattern morfologico di reazione stromale specifica, rispetto agli altri gruppi immunofenotipici, essi risultano arricchiti in cellule stromali PDGFR $\beta$ + compatibili con CAFs, mostrano una più elevata densità di vascolarizzazione linfatica intra e peritumorale e vascolarizzazione globale peritumorale [Figure 5.1 e 5.2].

Per quanto riguarda l'immunoscore, il 48% dei TNBC mostra alti valori di immunoscore i3 o i4 e nell'ambito dei tumori con alto immunoscore, questi sono caratterizzati da una elevata densità di linfociti PD1+ e PDL1 a contatto con il tumore [Figura 5.3].

Dallo studio della casistica, costituita da carcinomi duttali invasivi NST, il primo dato emerso è rappresentato da una correlazione positiva, statisticamente significativa, tra l'immunoscore, determinato dalla densità di linfociti CD3+ e CD8+ presenti nelle due aree tumorali più rilevanti (centro-tumorale e periferica), ed il sottogruppo fenotipico (*Luminal A*, *Luminal B Ki67-high*, *Luminal B Her2+*, *Her2-enriched* e *Triple negative*), quest'ultimo inteso come variabile prognostica e predittiva. I valori più elevati di immunoscore sono stati riscontrati nei carcinomi *triplo-negativi*, osservando valori medi progressivamente inferiori, rispettivamente nei carcinomi *HER2-enriched*, *luminal B Her2+* e *luminal B Ki67-high* e *luminal A*.

Tale correlazione è spiegabile, almeno in parte, con una maggiore eterogeneità genetica e, quindi, antigenica nelle forme di carcinoma triplo-negative (peraltro scarsamente differenziate) rispetto alle forme luminali.

Una maggiore eterogeneità genetica, legata alla presenza di un substrato mutazionale più ampio, giustificherebbe la maggiore attivazione di una risposta immunitaria anti-tumorale. Tuttavia, è proprio la stimolazione antigenica cronica che porterebbe all'attivazione di meccanismi di autoprotezione da parte del sistema immunitario, come "l'esauzione" delle cellule T, mediante recettori inibitori, fisiologicamente deputati al controllo della risposta immune (*immune checkpoint*).

L'analisi morfologica, suffragata dai test statistici di correlazione, ci ha permesso di evidenziare, nei carcinomi triplo-negativi con immunoscore elevato (i3 o i4), la frequente presenza di un infiltrato T linfocitario PD-1+ e PD-L1 [Figura 5.3] e questo aiuta a spiegare la prognosi spesso infausta associata intrinsecamente a tali forme di carcinoma e la scarsa tendenza alla risposta ai trattamenti chemioterapici tradizionali. Affinchè, infatti, un trattamento chemioterapico antineoplastico possa avere efficacia, è necessaria una adeguata partecipazione del sistema immunitario, che invece sembrerebbe spesso esausto nei carcinomi triplo-negativi con abbondante infiltrato linfoide tumore-associato ed alta densità di linfociti PD-1+ e PD-L1.

I risultati del presente lavoro, in linea con gli studi già riportati in letteratura, confermano l'utilità di terapie mirate contro l'asse del checkpoint immunologico PD1/PDL1 basate sull'utilizzo di anticorpi monoclonali in associazione ai regimi chemioterapici tradizionali.

Inoltre, riteniamo ipotizzabile l'applicabilità della valutazione dell'immunoscore nella pratica clinica come strumento predittivo di risposta al trattamento immunoterapico, essendo direttamente correlato alla presenza di elevati livelli di cellule PD-L1+ e PD-1+. La valutazione dell'immunoscore, basato sull'esecuzione di due colorazioni immunoistochimiche, CD3 e CD8, largamente diffuse nei laboratori di Anatomia Patologica, potrebbe consentire di ottenere preziose informazioni predittive a basso costo. Dall'analisi dei casi studiati, il gruppo immunofenotipico e la densità dell'infiltrato linfoide, espressa in termini di immunoscore, sembrerebbero correlare positivamente, altresì, con la presenza di canali vascolari bordati da cellule atipiche CD31+, PDGFR $\beta$ + e PanCK+, morfologicamente riferibili a fenomeni di mimetismo vascolare [Figura 5.3]. Tale fenomeno, descritto per la prima volta circa venti anni fa nel melanoma, è legato al processo di transizione epitelio-mesenchimale, ormai ampiamente dimostrato anche nei carcinomi della mammella e in particolare nei triplo-negativi, appartenenti ai sottogruppi molecolari *Mesenchymal stem-like e mesenchimale*, ad ulteriore conferma della notevole eterogeneità genetica che caratterizza tali forme<sup>323</sup>.

La presenza di più elevati livelli stromali di PDGFR $\beta$ , espresso da cellule a morfologia fusata compatibili con CAFs, riscontrata nel 19% dei carcinomi triplo-negativi della casistica in studio, è indicativa di una maggiore partecipazione da parte dello stroma neoplastico rispetto alle altre forme immunofenotipiche. Tale dato conferma quanto già

riportato da alcuni Autori circa il significato di fattore prognostico sfavorevole; elevati livelli stromali di PDGFR $\beta$  sembrerebbero inoltre associati a una minore risposta al trattamento con tamoxifene nelle forme ormono-positivo<sup>324,325</sup>. La presenza di cellule stromali PDGFR $\beta$ + potrebbe, peraltro, aprire la strada ad ulteriori possibilità terapeutiche, basate sull'impiego di inibitori dei recettori ad attività tirosin-chinasica. Studi sperimentali su modelli animali di carcinoma del colon-retto hanno evidenziato che l'inibizione dell'attività dei recettori per PDGF (es. imatinib, sunitinib), espressi nei fibroblasti associati al tumore, determina una riduzione della crescita neoplastica, potenziando l'efficacia dei chemioterapici anti-neoplastici tradizionali<sup>132</sup>

I più elevati livelli di vascolarizzazione intra- e peritumorale riscontrati nel gruppo di carcinomi triplo-negativi potrebbero rappresentare il razionale per il trattamento con farmaci ad azione antiangiogenetica. Un approccio terapeutico anti-angiogenetico era già stato adottato nella terapia del carcinoma mammario; nel 2008 era infatti stata approvata dalla FDA la terapia con Bevacizumab, anticorpo monoclonale antiVEGFR, poi abbandonato nel 2011 a causa di dati scientifici discordanti<sup>4</sup>.

Di particolare interesse, è, infine, la presenza di un subset di carcinomi triplo-negativi caratterizzati dall'espressione del recettore androgenico. Il dato ottenuto, anch'esso in linea con quanto già noto in letteratura scientifica, sembrerebbe avere un significato prognostico e, inoltre, aprirebbe a nuove possibilità terapeutiche basate sull'impiego di farmaci ad azione anti-androgenica<sup>326-332</sup>. La positività del recettore androgenico, nella casistica in studio, non era legata alla presenza di istotipi speciali a differenziazione apocrina, essendo le forme speciali state escluse dalla selezione dei casi; solo un caso mostrava focali aspetti di differenziazione apocrina.

Il sottogruppo di carcinomi triplo-negativi con positività del recettore androgenico si caratterizza per aspetti biologici intrinseci di minore aggressività (necrosi, dimensioni, basso indice di proliferazione, bassa percentuali di TILs, bassi valori di immunoscore, basse percentuali di linfociti PDL1+). In particolare, la percentuale di positività per il recettore androgenico risulta inversamente correlata all'indice di proliferazione cellulare [Figura 5.4]. Tali aspetti come riportato dalla letteratura, potrebbero essere responsabili di una minore risposta alla chemioterapia basata sul blocco della proliferazione cellulare e minore efficacia della immunoterapia. Per tali ragioni, la presenza del recettore androgenico nei carcinomi triplo-negativi rappresenterebbe da un lato un fattore

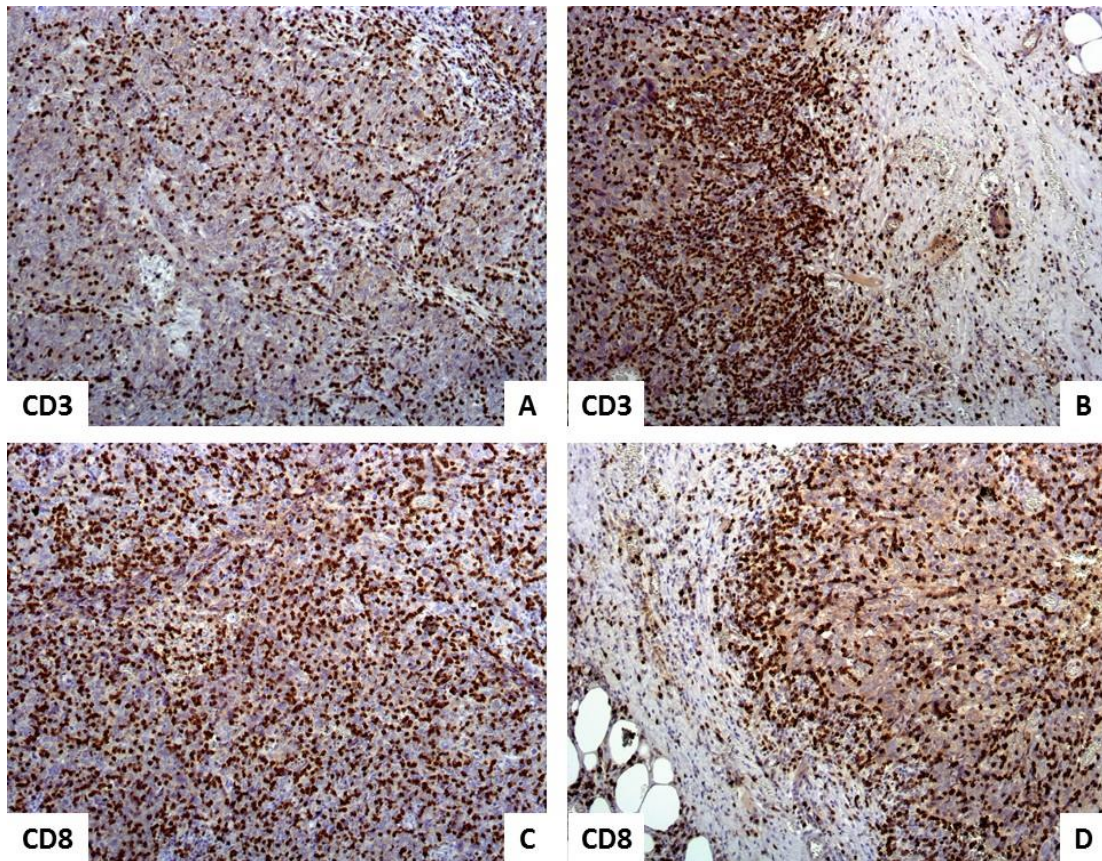
prognostico positivo, poiché legato a caratteristiche biologiche di minore aggressività, dall'altro un fattore predittivo negativo di risposta alla chemioterapia e all'immunoterapia per i motivi sopraesposti.

Queste pazienti potrebbero, pertanto, giovare di terapie mirate con farmaci ad azione antiandrogenica, come sostenuto da alcuni gruppi di ricerca. A tal proposito, sono attualmente in corso trial clinici basati proprio sulla somministrazione di farmaci quali bicalutamide ed enzalutamide, farmaci ad azione antagonista sul recettore androgenico e già utilizzati nel trattamento del carcinoma prostatico, attualmente giunti in fase 2 con risultati promettenti, con un *rate* di risposta, in termini di beneficio clinico e di intervallo libero da progressione, del 19% e del 33% rispettivamente<sup>317</sup>. Sussistono però ancora alcuni aspetti da chiarire nell'ambito del significato biologico del recettore androgenico nella mammella. Infatti, il suo ruolo bivalente, come soppressore e induttore della progressione tumorale, tiene aperte molteplici possibilità terapeutiche basate sull'utilizzo di farmaci agonisti e antagonisti<sup>9</sup>.

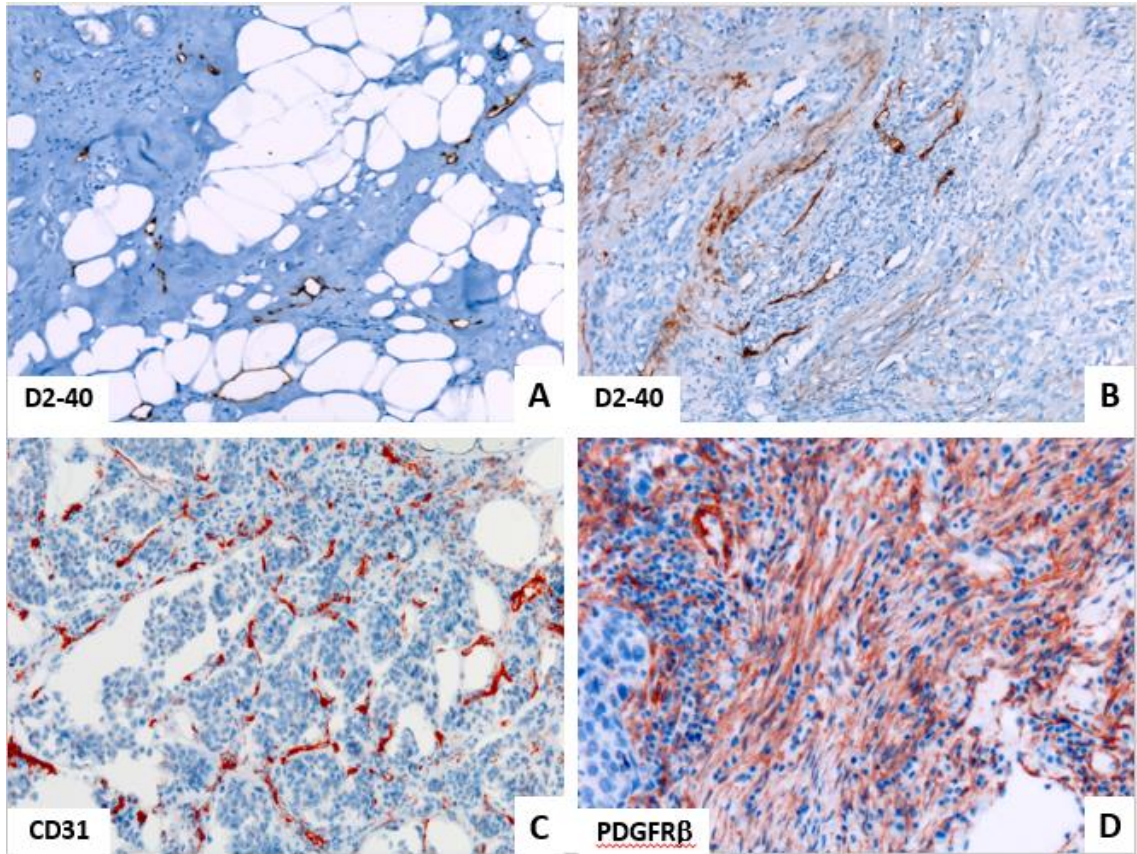
Il presente lavoro, lungi dal voler ottenere risultati di assoluta certezza, anche a causa dell'assenza di informazioni sull'*outcome* delle pazienti, ha avuto come scopo quello di dimostrare quanto complessa sia la biologia delle neoplasie mammarie e che l'approccio allo studio delle stesse debba essere di tipo globale, considerando anche ciò che apparentemente non sia direttamente legato alla componente neoplastica primaria.

Solo in questo modo, a nostro avviso, si potranno ottenere informazioni prognostiche e predittive maggiormente precise, al fine attuare approcci terapeutici sempre più mirati, personalizzati e, quindi, più efficaci.



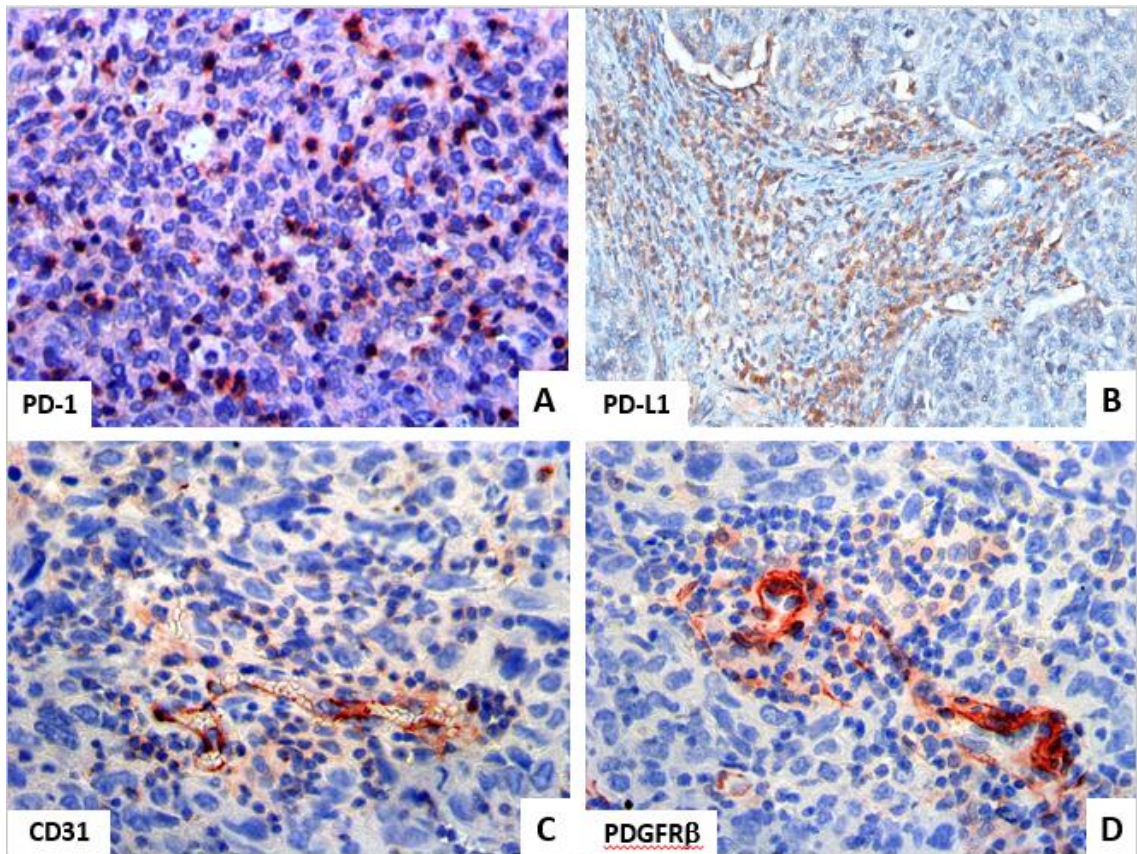


**Figura 5.1** – Carcinoma duttale invasivo NST G3, triplo-negativo. Aree valutate nella determinazione dell'immunoscore secondo il metodo proposto da Galon et al nei carcinomi del colon-retto. **A-B:** Colorazione immunoistochimica per CD3 e valutazione delle cellule positive nelle aree centro-tumorali (A) e periferiche (B). **C-D:** Colorazione per CD8 per la valutazione delle cellule positive nelle are centro-tumorali e periferiche. In questo campione è stato ottenuto un immunoscore i4.

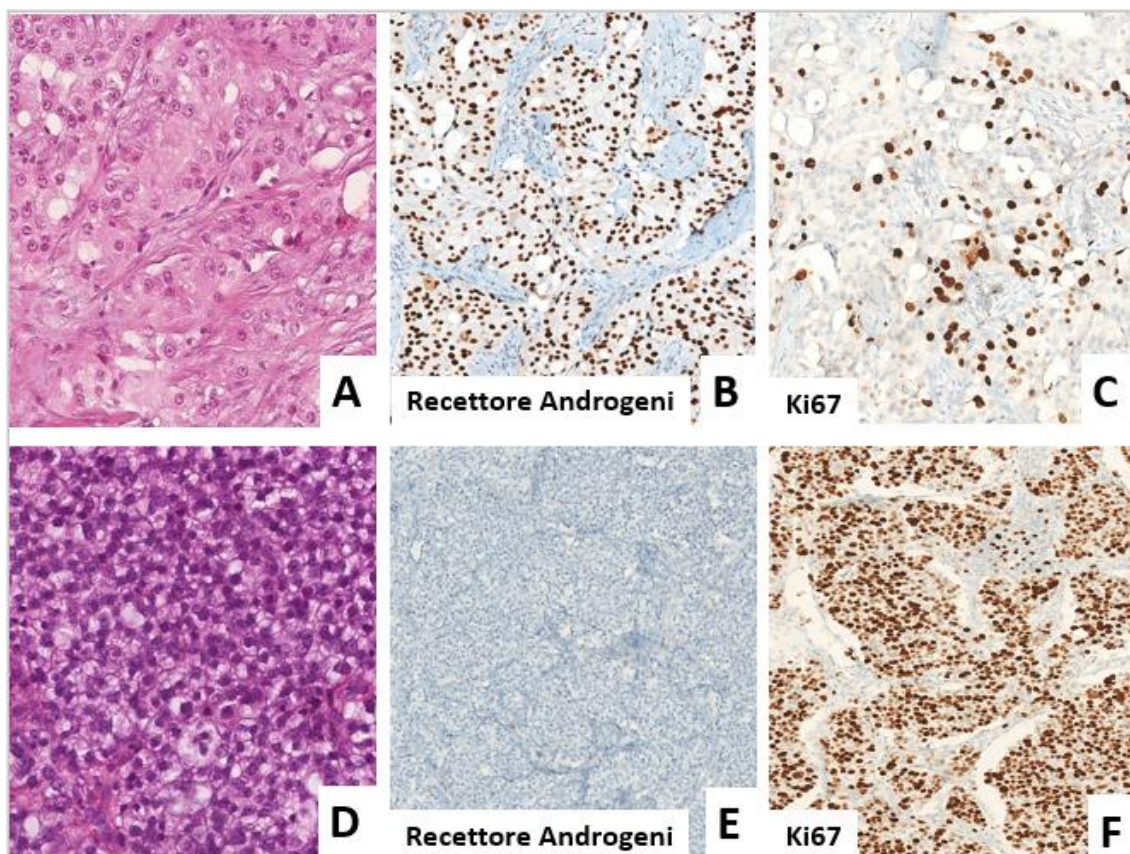


**Figura 5.2** – Stesso caso della figura 5.1. **A:** La colorazione immunohistochimica per D2-40 evidenzia una moderata densità vasi linfatici nello stroma peritumorale. **B:** La colorazione immunohistochimica per D2-40 evidenzia una moderata densità vasi linfatici nello stroma intratumorale. **C:** La colorazione immunohistochimica per CD31 evidenzia una elevata vascolarizzazione complessiva dello stroma intratumorale. **D:** La colorazione immunohistochimica per PDGFR $\beta$ + evidenzia numerose cellule stromali a morfologia fusata compatibili con CAFs.





**Figura 5.3** – Stesso caso delle figure 5.1 e 5.2. **A:** La colorazione immunohistochimica per PD-1 evidenzia una alta densità di linfociti PD-1+. **B:** Morfologicamente le cellule neoplastiche sono caratterizzata da elevato pleomorfismo cito-nucleare, pattern di crescita solido, elevata attività mitotica con presenza di figure mitotiche atipiche, tri- e tetrapolari; lo stroma risulta scarsamente rappresentato e costituito da rari ed esili tralci fibro-vascolari. Si evidenzia nella figura B la presenza di lacune vascolari, bordate da cellule atipiche e pleomorfe, che all'immunohistochimica risultano CD31+ (C), PDGFR $\beta$ + (D) e PanCK+, riferibili a fenomeni di mimetismo vascolare.



**Figura 5.4** – In Alto – A: Carcinoma duttale infiltrante NST G2, triplo-negativo AR-positivo – B: Diffusa e intensa positività nucleare nel 98% delle cellule neoplastiche alla colorazione immunoistochimica per il recettore per androgeni. C: La colorazione immunoistochimica per Ki67 ha evidenziato un indice di proliferazione cellulare del 25% circa.

In Basso – D: Carcinoma duttale infiltrante NST G2, triplo-negativo AR-negativo – E: Assenza di espressione del recettore androgenico nelle cellule neoplastiche. F: La colorazione immunoistochimica per Ki67 ha evidenziato un indice di proliferazione cellulare del 90% circa.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. I numeri del cancro in Italia 2020. AIOM-AIRTUM-Fondazione AIOM. [www.aiom.it](http://www.aiom.it)
2. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406 (6797): 747-52.
3. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869-10874.
4. Madu CO, Wang S, Madu CO, Lu Y. Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. *J Cancer*. 2020; 11(15): 4474–4494
5. Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI. The pathology of tumor stromatogenesis. *Cancer Biol Ther* 2007;6(5):639-45. doi: 10.4161/cbt.6.5.4198. Epub 2007 May 30.
6. Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: Microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation* 2002;70:537-46.
7. Willhauck MJ, Mirancea N, Vosseler S, Pavesio A, Boukamp P, Mueller MM, Fusenig NE, Stark HJ. Reversion of tumour phenotype in surface transplants of skin SCC cells by scaffold-induced stroma modulation. *Carcinogenesis* 2006; 28:595-610.
8. Galon et al, Toward the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 2014; 232:199-209.
9. Anestis A, Zoi I, Papavassiliou AG, Karamouzis MV. Androgen Receptor in Breast Cancer-Clinical and Preclinical Research Insights. *Molecules* 2020 Jan 15;25(2):358. doi: 10.3390/molecules25020358.
10. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, de Jong D, Van de Vijver MJ, Van't Veer LJ, Peterse JL. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*. 2008 Oct; 216 (2): 141-50.
11. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol*. 2010 Jun; 4 (3): 192-208.
12. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Dec; 6 (12): 718-30. Review. PubMed PMID: 19942925.
13. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol*. 2018;36:2105-2122.
14. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 Sep 2; 100 (18): 10393-8.



15. Desai KV, Xiao N, Wang W, Gangi L, Greene J, Powell JI, Dickson R, Furth P, Hunter K, Kucherlapati R, Simon R, Liu ET, Green JE. Initiating oncogenic event determines gene-expression patterns of human breast cancer models. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 May 14;99(10):6967-72. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 Jul 23;99(15):10227.
16. Prat A, Parker JS, Karginova O et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12:R68.
17. Korkaya H, Paulson A, Iovino F et al. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene* 2008;27:6120-6130.
18. Turner NC, Reis-Filho JS, Russel AM, Springall RJ, Ryder K, Steele D, Savage K, Gillett CE, Schmitt FC, Ashworth A, Tutt AN. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene*. 2007 Mar 29;26(14):2126-32.
19. Liu S, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Foco H, Kleer CG, Merajver SD, Dontu G, Wicha MS. BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Feb 5;105(5):1680-5.
20. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, Perou CM, Nielsen TO. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar 1;14(5):1368-76.
21. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, Birnbaum D. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer*. 2008 Jul 1;123(1):236-40.
22. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER) negative, progesterone receptor (PR) negative and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*. 2007.
23. Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P, Schwartz GF, Park PK, Rosenberg AL, Brill K, Mitchell EP. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results database. *Cancer*. 2007 Aug 15;110(4):876-84.
24. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 15;13(8):2329-34.
25. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Triple negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4429-34.
26. Lyndsay N Harris, Gloria Broadwater, Nancy U Lin, Alexander Miron, Stuart J Schnitt, David Cowan, Jonathan Lara, Ira Bleiweiss, Donald Berry, Matthew Ellis, Daniel F Hayes, Eric P Winer, Lynn Dressler. Molecular subtypes of breast cancer in relation to paclitaxel response and outcomes in women with metastatic disease: results from CALGB 9342 *Breast Cancer Res*. 2006;8(6):R66.
27. Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, Harris L, Hait W, Toppmeyer D. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 20;24(36):5652-7.

28. Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR, Huntsman DG, Cheang MC, Akslen LA, Nielsen TO, Foulkes WD. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2007 Jul 24;7:134.
29. Foulkes WD, Metcalfe K, Hanna W, Lynch HT, Ghadirian P, Tung N, Olopade O, Weber B, McLennan J, Olivotto IA, Sun P, Chappuis PO, Begin LR, Brunet JS, Narod SA. Disruption of the expected positive correlation between breast tumor size and lymph node status in BRCA1-related breast carcinoma. *Cancer*. 2003 Oct 15;98(8):1569-77.
30. Tavassoli F. *Tumors of the Mammary Gland (AFIP Atlas of Tumor Pathology, Series 4, Vol 10)* 2009.
31. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, Birnbaum D. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer* 2008;123:236-240.
32. Correa Geyer F, Reis-Filho JS. Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: are we there yet? *Int J Surg Pathol* 2009;17:285-302.
33. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1938-1948.
34. Haupt B, Ro JY, Schwartz MR. Basal-like breast carcinoma: a phenotypically distinct entity. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Jan;134(1):130-3.
35. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple negative breast cancer. *Cancer*. 2007 Jan 1;109(1):25-32.
36. Moinfar F. Is “basal-like” carcinoma of the breast a distinct clinicopathological entity? A critical review with cautionary notes. *Pathobiology*. 2008;75(2):119-31.
37. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol*. 2006.
38. Rodriguez-Pinilla SM, Rodriguez-Gil Y, Moreno-Bueno G, Sarriò D, Martin-Guijarro Mdel C, Hernandez L, Palacios J. Sporadic invasive breast carcinomas with medullary features display a basal-like phenotype: an immunohistochemical and gene amplification study. *Am J Surg Pathol*. 2007.
39. Leibl S, Moinfar F. Metaplastic breast carcinomas are negative for Her-2 but frequently express EGFR (Her-1): potential relevance to adjuvant treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors? *J Clin Pathol*. 2005 Jul;58(7):700-4.
40. Hirokawa M, Sugihara K, Sai T, Monobe Y, Kudo H, Sano N, Sano T. Secretory carcinoma of the breast: a tumour analogous to salivary gland acinic cell carcinoma? *Histopathology*. 2002.
41. Pia-Foschini M, Reis-Filho JS, Eusebi V, Lakhani SR. Salivary gland-like tumours of the breast: surgical and molecular pathology. *J Clin Pathol*. 2003 Jul;56(7):497-506. Review. Erratum in: *J Clin Pathol*. 2003 Oct;56(10):804.
42. Cabibi D, Giannone AG et al. CD10 and HHF35 actin in the differential diagnosis between Collagenous spherulosis and adenoid-cystic carcinoma of the breast. *Pathol Res Pract*. 2012 Jul 15;208(7):405-9. doi: 10.1016/j.prp.2012.05.002. Epub 2012 May 31.
43. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121:2750-2767.

44. Bertucci F, Finetti P, Cervera N et al. Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. *Cancer Res* 2006;66:4636-4644.
45. Gerhard R, Ricardo S, Albergaria A et al. Immunohistochemical features of claudin-low intrinsic subtype in metaplastic breast carcinomas. *Breast* 2012;21:354-360.
46. Prat A, Parker JS, Karginova O et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12:R68.
47. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 2007;8:R76.
48. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* 2011;16(Suppl. 1):61-70.
49. Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, et al. Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res* 2004;64:3037-3045.
50. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005;24:4660-4671.
51. Shekhar MPV, Werdell J, Santner SJ, Pauley RJ, Tait L. Breast Stroma Plays a Dominant Regulatory Role in Breast Epithelial Growth and Differentiation: Implications for Tumor Development and Progression. *Cancer Research* 2001. 61, 1320–1326.
52. Weiss L. Biomechanical interactions of cancer cells with the microvasculature during hematogenous metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11:227-35.
53. Saini A. Cell adhesion molecules in cancer. In: Vile RG, ed. *Cancer Metastasis: From Mechanisms to Therapies*. Chichester: John Wiley and Sons, 1995:71-98.
54. Stoker M, Gherardi E. Regulation of cell movement: The motogenic cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072:88-102.
55. Rosen EM, Knesel J, Goldberg ID. Scatter factor and its relationship to hepatocyte growth factor and met. *Cell Growth Differ* 1991; 2:603-7.
56. Vile RG. Invasion in cancer metastasis—The journey from the primary tumour to the circulation. In: Vile RG, ed. *Cancer Metastasis: From Mechanisms to Therapies*. Chichester: John Wiley and Sons, 1995:21-46.
57. Strauli P, Haemmerli O. The role of cancer cell motility in invasion. *Cancer Metastasis Rev* 184; 3:127-31.
58. Enterline HT, Coman DR. The amoeboid motility of human and animal neoplastic cells. *Cancer* 1950; 3:1033-8.
59. Mohler JL, Partin AW, Coffey DS. Prediction of metastatic potential by a new grading system of cell motility: Validation in the Dunning R-3327 prostatic adenocarcinoma model. *J Urol* 1987; 138:168-70.
60. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64:327-36.
61. Aznavoorian S, Murphy A, Stetler-Stevenson WG. Molecular aspects of tumour cell invasion and metastasis. *Cancer* 1993; 71:1368-83.
62. Basset P, Bellocq JP, Wolf C. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinoma. *Nature* 1990; 348:699-704.
63. Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. The vascular network of tumours - What is it not for? *J Pathol* 2003; 201:173-80.



64. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; 29:15-8.
65. Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. "Stromatogenesis" and tumour progression. *Int J Surg Pathol* 2004; 12:1-9.
66. Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. Proliferating fibroblasts at the invading tumour edge of colorectal adenocarcinomas are associated with endogenous markers of hypoxia, acidity, and oxidative stress. *J Clin Pathol* 2005; 58:1033-8.
67. Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI. Tumour angiogenesis: Vascular growth and survival. *APMIS* 2004; 112:431-40.
68. Sivridis E, Giatromanolaki A, Galazios G, Koukourakis MI. Node-related factors and survival in node-positive breast carcinomas. *Breast* 2005; 15:382-9.
69. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, Sivridis E. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: A metabolic survival role for tumour-associated stroma. *Cancer Res* 2006; 66:632-7.
70. Redler P, Lustig ES. Differences in the growth-promoting effect of normal and peritumoral dermis on epidermis in vitro. *Dev Biol* 1968; 17:679-91.
71. Dawe CJ, Morgan WD, Slatick MS. Influence of epithelio-mesenchymal interactions on tumour induction by polyoma virus. *Int J Cancer* 1966; 1:419-50.
72. Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ, Ricke WA. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer* 2003; 107:1-10.
73. Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, Washington MK, Neilson EG, Moses HL. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 2004; 303:848-51.
74. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumour progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999; 59:5002-11.
75. Shekhar MP, Werdell J, Santner SJ, Pauley RJ, Tait L. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: Implications for tumour development and progression. *Cancer Res* 2001; 61:1320-6.
76. Kitadai Y, Sasaki T, Kuwai T, Nakamura T, Bucana CD, Hamilton SR, Fidler IJ. Expression of activated platelet-derived growth factor receptor in stromal cells of human colon carcinomas is associated with metastatic potential. *Int J Cancer* 2006; 119:2567-74.
77. Cekanova M, Masi T, Plummer IIIrd HK, Majidi M, Fedorocko P, Schuller HM. Pulmonary fibroblasts stimulate the proliferation of cell lines from human lung adenocarcinomas. *Anticancer Drugs* 2006; 17:771-81.
78. Fromigue O, Louis K, Dayem M, Milanini J, Pages G, Tartare-Deckert S, Ponzio G, Hofman P, Barbry P, Auberger P, Mari B. Gene expression profiling of normal human pulmonary fibroblasts following coculture with non-small-cell lung cancer cells reveals alterations related to matrix degradation, angiogenesis, cell growth and survival. *Oncogene* 2003; 22:8487-97.
79. Nakagawa H, Liyanarachchi S, Davuluri RV, Auer H, Martin Jr EW, de la Chapelle A, Frankel WL. Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene* 2004; 23:366-77.
80. Liu Y, Kalen A, Risto O, Wahlstrom O. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen* 2002; 10:336-40.

81. Lagace R, Grimaud JA, Shurch W, Seemayer TA. Myofibroblastic stromal reaction in carcinomas of the breast and variations of collagenous matrix and structural glycoproteins. *Virchows Arch* 1985; 408:49-59.
82. Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulosom R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA. Bone marrow contribution to tumour-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res* 2004; 64:8492-5.
83. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer *Nat Rev Cancer*. 2006 May;6(5):392-401. doi: 10.1038/nrc1877.
84. Cheng JD, Dunbrack Jr RL, Valianou M, Rogatko A, Alpaugh RK, Weiner LM. Promotion of tumour growth by murine fibroblast activation protein, a serine protease, in an animal model. *Cancer Res* 2002; 62:4767-72.
85. Briggs J, Chamboredon S, Castellazzi M, Kerry JA, Bos TJ. Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells. *Oncogene* 2002; 21:7077-91.
86. Schultz C, Lemke N, Ge S, Golembieski WA, Rempel SA. Secreted protein acidic and rich in cysteine promotes glioma invasion and delays tumour growth in vivo. *Cancer Res* 2002;62:6270-7.
87. Gabbiani G, Lelous M, Bailey AJ, Bazin S, Delauney A. Collagen and myofibroblasts of granulation tissue. *Virchows Archiv [Cell Pathol]* 1976; 21:133-45.
88. Lynch CC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in tumour-host cell communication. *Differentiation* 2002; 70:561-73.
89. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: Biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000; 18:1135-49.
90. Schuler T, Kornig S, Blankenstein T. Tumour rejection by modulation of tumour stromal fibroblasts. *J Exp Med* 2003; 198:1487-93.
91. Furuhashi M, Sjoblom T, Abramsson A, Ellingsen J, Micke P, Li H, Bergsten-Folestad E, Eriksson U, Heuchel R, Betsholtz C, Heldin CH, Ostman A. Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumours and an associated increase in tumour growth rate. *Cancer Res* 2004; 64:2725-33.
92. Ishii G, Sangai T, Sugiyama K, Ito T, Hasebe T, Endoh Y, Magae J, Ochiai A. In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem Cells* 2005; 23:699-706.
93. Sangai T, Ishii G, Kodama K, Miyamoto S, Aoyagi Y, Ito T, Magae J, Sasaki H, Nagashima T, Miyazaki M, Ochiai A. Effect of differences in cancer cells and tumour growth sites on recruiting bone marrow-derived endothelial cells and myofibroblasts in cancer-induced stroma. *Int J Cancer* 2005; 115:885-92.
94. Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth factor-beta 1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res* 2000; 257:180-9.
95. Lieubeau B, Garrigue L, Barbieux I, Meflah K, Gregoire M. The role of transforming growth factor beta 1 in the fibroblastic reaction associated with rat colorectal tumour development. *Cancer Res* 1994; 54:6526-32.
96. Dalal BI, Keown PA, Greenberg AH. Immunocytochemical localization of secreted transforming growth factor-beta 1 to the advancing edges of primary tumors and to

- lymph node metastases of human mammary carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143:381-9.
97. Yu J, Moon A, Kim HR. Both platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)-alpha and PDGFR-beta promote murine fibroblast cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282:697-700.
  98. Shao ZM, Nhuyen M, Barsky SH. Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene* 2000; 19:4337-45.
  99. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269:6271-4.
  100. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Thorpe PE, Brekken RA, Sivridis E, Kakolyris S, Georgoulas V, Gatter KC, Harris AL. Vascular endothelial growth factor/KDR activated microvessel density versus CD31 standard microvessel density in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000; 60:3088-95.
  101. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E. Lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 5: Differential expression by neoplastic and stromal cells in non-small cell lung cancer and other epithelial malignant tumors. *Tumour Biol* 2003; 24:199-202.
  102. Castañeda-Gill JM, Vishwanatha JK. Antiangiogenic mechanisms and factors in breast cancer treatment. *J Carcinogenesis* 2016; 15: 1.
  103. Coelho AL, Gomes MP, Catarino RJ, et al. Angiogenesis in NSCLC: is vessel co-option the trunk that sustains the branches? *Oncotarget* 2017; 8: 39795–804.
  104. Sim EK, Zhang L, Shim WS, Lim YL, Ge R. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *J Card Surg.* 2002; 17: 350–4.
  105. Hanahan D, Weinberg RA. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646–74.
  106. Folkman J, Browder T, Palmblad J. Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 23–33.
  107. Tannock IF. The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *British J Cancer.* 1968; 22: 258–73.
  108. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005; 438: 932-6
  109. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995; 1: 27-31.
  110. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86: 353–64.
  111. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992; 267:10931–4.
  112. Folkman J. Tumour angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971; 285: 1182–6.
  113. Fong G, Rossant J, Gartsenstein M et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995; 376: 67–70.
  114. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP et al. Failure of blood island formation and vasculogenesis in FLK-1 deficient mice. *Nature.* 1995; 376: 62–6.
  115. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 282: 947–70.
  116. Horak ER, Klenk N, Leek R, et al. Angiogenesis, assessed by platelet/EC adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet.* 1992; 340: 1120–4.

117. Vartanian RK, Weidner N. Correlation of intratumoral EC proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol.* 1994; 144: 1188–94.
118. Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991; 324: 1–8.
119. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, et al. Does vascular endothelial growth factor (VEGF) predict local relapse and survival in radiotherapy-treated node-negative breast cancer? *Br J Cancer.* 1999; 81: 727–32.
120. George ML, Tutton MG, Janssen F, et al. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia.* 2001; 3: 420–7.
121. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1995; 1: 149–53.
122. Deplanque G, Harris AL. Anti-angiogenic agents: Clinical trial design and therapies in development. *Eur J Cancer* 2000; 36:1713-24.
123. Fisher JF, Mobashery S. Recent advances in MMP inhibitor design. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25:115-36.
124. Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, Heim W, Berlin J, Holmgren E, Hambleton J, Novotny WF, Kabbinavar F. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: An active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:3502-8.
125. Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U, et al. Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2009; 20: 1639–46.
126. [Internet] FDA Approval for Bevacizumab n.d. 2015, Sep 16. <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-bevacizumab>
127. Tarallo V, De Falco S. The vascular endothelial growth factors and receptors family: up to now the only target for anti-angiogenesis therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015; 64: 185–9.
128. Bellou S, Pentheroudakis G, Murphy C, et al. Anti-angiogenesis in cancer therapy: Hercules and Hydra. *Cancer Lett.* 2013; 338: 219–28.
129. Ivy SP, Wick JY, Kaufman BM. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009; 6: 569–79.
130. Miles DW, Chan A, Dirix LY, et al. Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 3239–47.
131. Robert NJ, Dieras V, Glaspy J, et al. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 1252–60.
132. Kitadai Y, Sasaki T, Kuwai T, Nakamura T, Bucana CD, Fidler IJ. Targeting the expression of platelet-derived growth factor receptor by reactive stroma inhibits growth and metastasis of human colon carcinoma. I. *Am J Pathol* 2006; 169:2054-65.
133. G.P. Dunn, L.J. Old, R.D. Schreiber The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 2004.

134. R.D. Schreiber, L.J. Old, M.J. Smyth. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, 2011.
135. J. Galon, D. Bruni. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2019.
136. K.M. Bussard, et al. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2016.
137. Terry, S. Buart, S. Chouaib Hypoxic stress-induced tumor and immune plasticity, suppression, and impact on tumor heterogeneity. *Front. Immunol.* 2017.
138. L. Zitvogel, et al. The microbiome in cancer immunotherapy: diagnostic tools and therapeutic strategies. : *Science*, 2018.
139. A. Dzutsev, et al. Microbes and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 2017.
140. C. Sautes- Fridman, et al. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2019.
141. C. Sautes-Fridman, et al. Tertiary lymphoid structures in cancers: prognostic value, regulation, and manipulation for therapeutic intervention.: *Front. Immunol.*, 2016.
142. J. Galon, et al. J. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *Transl. Med*, 2012.
143. Constantin N. Baxevanis, Sotirios P. Fortis, Sonia A. Perez. The balance between breast cancer and the immune system: Challenges for prognosis and clinical benefit from immunotherapies. *Semin Cancer Biology*, 2019.
144. A. Spellman, S.C. Tang. Immunotherapy for breast cancer: past, present, and future. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2016.
145. S.M. Mahmoud, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol*, 2011.
146. Seo AN, Lee HJ, Kim EJ et al. Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *British Journal of Cancer*, 2013.
147. D. Fang, J. Zhu. Dynamic balance between master transcription factors determines the fates and functions of CD4 T cell and innate lymphoid cell subsets. *Journal of Experimental Medicine*, 2017.
148. Bates GJ, Fox SB, Han C et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. . *Journal of Clinical Oncology*, 2006.
149. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Research*, 2009.
150. West NR, Kost SE, Martin SD et al. Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *British Journal of Cancer*, 2013.
151. Gu- Trantien C, Loi S, Garaud S et al. CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *Journal of Clinical Investigation*, 2013.
152. W.H. Fridman, et al. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2017.
153. M. Tosolini, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer, . *Cancer Research*, 2011.
154. Teschendorff AE, Gomez S, Arenas A et al. Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules. . *BMC Cancer*, 2010.

155. E. Osawa, et al. Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *International Journal of Cancer*, 2006.
156. V Kaewkangsadan et al. Crucial contributions by t lymphocytes (Effector, regulatory, and checkpoint inhibitor) and cytokines (TH1, TH2, and TH17) to a pathological complete response induced by neoadjuvant chemotherapy in women with breast cancer. *Journal Immunology Research.*, 2016.
157. Qi W, Huang X, Wang J. Correlation between Th17 cells and tumor microenvironment. *Cellular Immunology*, 2013.
158. Z. Asadzadeh, et al. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cellular Immunology*, 2017.
159. P. Muranski, N.P. Restifo. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*, 2013.
160. Whiteside., T.L Targeting adenosine in cancer immunotherapy: a review of recent progress. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2017.
161. D.C. Linehan, P.S. Goedegebuure CD25+ CD4+ regulatory T-cells in cancer. *Immunologic Research*, 2005.
162. S.D. Bohling, K.H. Allison. Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: a potential therapeutic target. *Modern Pathology*, 2008.
163. M. Ohara, et al. Possible involvement of regulatory T cells in tumor onset and progression in primary breast cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2009.
164. D.G. DeNardo, Barreto JB, Andreu P et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*, 2009.
165. M. Gobert, et al., Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome, *Cancer Res.* 69 (5) (2009) 2000–2009.
166. W. Tan, et al., Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. W. Tan, et al. *Nature*, 2011.
167. J. Shou, et al Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 2016.
168. Y. Asano, et al Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer. *British Journal of Surgery*, 2016.
169. Whiteside, T.L. Disarming suppressor cells to improve immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2012.
170. An T, Sood U, Pietruk T et al In situ quantitation of inflammatory mononuclear cells in ductal infiltrating breast carcinoma. Relation to prognostic parameters. *Am J Pathol* 1987; 128: 52– 60.
171. Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC et al. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. . *Breast Cancer Research and Treatment*, 2012.
172. A. Largeot, et al. The B-side of cancer immunity: the underrated tune. *Cells*, 2019.
173. R.D. Bense, et al. Relevance of tumor-infiltrating immune cell composition and functionality for disease outcome in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 2017.
174. J.P. Bottcher, et al. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell*, 2018.

175. Loi S, Michiels S, Salgado R et al. Tumor infiltrating lymphocytes is prognostic and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Annals of Oncology*, 2014.
176. Adams S, Demaria S, Goldstein L et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in Triple Negative Breast Cancers (TNBC) from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *Journal of Clinical Oncology*, 2014.
177. Denkert C, Loibl S, Noske A et al Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2010.
178. Loi S, Sirtaine N, Piette F et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*.
179. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology*, 2013.
180. C. Aspord, et al. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development, . *Journal of Experimental Medicine*, 2007.
181. M.L. Broz, et al. Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen presenting cells critical for t cell immunity. *Cancer Cell*, 2014.
182. A. de Mingo Pulido, et al TIM-3 regulates CD103(+) dendritic cell function and response to chemotherapy in breast cancer. *Cancer Cell*, 2018.
183. B. Ruffell, et al. Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells, . *Cancer Cell* 2, 2014.
184. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*, 2009.
185. G. Solinas, et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation, *Journal of Leukocyte Biology*, 2009.
186. M. Allen, J. Louise Jones. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *The Journal of Pathology*, 2011.
187. Y. Zhang, et al. High-infiltration of tumor-associated macrophages predicts unfavorable clinical outcome for node-negative breast cancer. *PLoS One*, 2013.
188. S. Tsutsui, et al. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncology Reports*, 2005.
189. Coussens LM, Pollard JW. Leukocytes in mammary development and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2011.
190. Systemic Monocytic-MDSCs are generated from monocytes and correlate with disease progression in breast cancer patients. C. Bergenfelz, et al. *PLOS ONE*, 2015.
191. M. Duechler, et al. The heterogeneous immune microenvironment in breast cancer is affected by hypoxia-related genes *Immunobiology*, 2014.
192. S. Solito, et al. A human promyelocytic-like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Blood*, 2011.
193. C.A. Corzo, et al. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Immunology*, 2009.
194. H. Li, et al. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *Journal of Immunology* , 2009.

195. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. D.I. Gabrilovich, S. Nagaraj. *Nature Reviews Immunology*, 2009.
196. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of Immunology*, 2008.
197. D. Shou, et al. Suppressive role of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the microenvironment of breast cancer and targeted immunotherapies.. *Oncotarget* , 2016.
198. J. Yu, et al. Noncanonical NF-kappaB activation mediates STAT3-stimulated IDO upregulation in myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Journal of Immunology*, 2014.
199. M. Bauer, et al. Heterogeneity of gene expression in stromal fibroblasts of human breast carcinomas and normal breast. *Oncogene*, 2010.
200. A. Orimo, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 2005.
201. U.E. Martinez-Outschoorn, M.P. Lisanti, F. Sotgia. Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. *Seminars in Cancer Biology*, 2014.
202. M.A. Giese, L.E. Hind, A. Huttenlocher. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood*, 2019.
203. V. Kumar, et al. The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trends in Immunology*, 2016.
204. R.V. Sionov, Z.G. Fridlender, Z. Granot. The multifaceted roles neutrophils play in the tumor microenvironment. *Cancer Microenvironment*, 2015.
205. S. Vols, R.V. Sionov, Z. Granot. Always look on the bright side: anti-tumor functions of neutrophils. *Current Pharmaceutical Design*, 2017.
206. J. Zeindler, et al. Infiltration by myeloperoxidase-positive neutrophils is an independent prognostic factor in breast cancer . *Breast Cancer Research and Treatment*, 2019.
207. A. Orimo, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 2005.
208. Liao, Z., Tan, Z. W., Zhu, P., & Tan, N. S. Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment – Accomplices in tumor malignancy. *Cellular Immunology.*, 2018.
209. A.N. Hosein, M. Wu, S.L. Arcand, S. Lavallee, J. Hebert, P.N. Tonin, M. Basik. Breast carcinoma-associated fibroblasts rarely contain p53 mutations or chromosomal aberrations. 2010 : *Cancer Research*.
210. W. Qiu, M. Hu, A. Sridhar, K. Opeskin, S. Fox, M. Shipitsin, M. Trivett, E.R. Thompson, M. Ramakrishna, K.L. Goringe, K. Polyak, I. Haviv, I.G. No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas. *Campbell. Nature Genetics*, 2008.
211. N. Kang, V.H. Shah, R. Urrutia. Membrane-to-nucleus signals and epigenetic mechanisms for myofibroblastic activation and desmoplastic stroma: potential therapeutic targets for liver metastasis? . *Molecular Cancer Research*, 2015.
212. Z. Wang, Y. Tan, W. Yu, S. Zheng, S. Zhang, L. Sun, K. Ding. Small role with big impact: miRNAs as communicators in the cross-talk between cancer-associated fibroblasts and cancer cells. *International Journal of Biology*, 2017.
213. P. Gandellini, F. Andriani, G. Merlino, F. D'Aiuto, L. Roz, M. Callari. Complexity in the tumour microenvironment: Cancer associated fibroblast gene expression



- patterns identify both common and unique features of tumour-stroma crosstalk across cancer types.. *Seminars in Cancer Biology*, 2015.
214. U.E. Martinez-Outschoorn, M.P. Lisanti, F. Sotgia, Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. *Semin. Cancer Biol.* 25 (2014) 47–60.
  215. Stromal cell expression of caveolin-1 predicts outcome in breast cancer. E.K. Sloan, et al. *The American Journal of Pathology*, 2009.
  216. Meier, D. et al. Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells. . *Immunity* , 2007.
  217. Colbeck, E. J., Ager, A., Gallimore, A. & Jones, G. W. Tertiary lymphoid structures in cancer: drivers of antitumor immunity, immunosuppression, or bystander sentinels in disease? *Frontiers in Immunology*, 2017.
  218. Luther, S. A. et al. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *Journal of Immunology*, 2002.
  219. Fleige, H. et al. IL-17-induced CXCL12 recruits B cells and induces follicle formation in BALT in the absence of differentiated FDCs. . *Journal of Experimental Medicine*, 2014.
  220. Savas, P. et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. . *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2016.
  221. Goc, J. et al. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+T cells. . *Cancer Research*, 2014.
  222. Truxova, I. et al. Mature dendritic cells correlate with favorable immune infiltrate and improved prognosis in ovarian carcinoma patients. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2018.
  223. G. P. Dunn, A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, R. D. Schreiber. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991 (2002).
  224. G. P. Dunn, L. J. Old, R. D. Schreiber, *Annu. Rev. Immunol.* 22, 329 (2004).
  225. V. Shankaran et al., The three Es of cancer immunoediting. *Nature* 410, 1107 (2001).
  226. G. Zhou, Z. Lu, J. D. McCadden, H. I. Levitsky, A. L. Marson, The allogeneic effect revisited: exogenous help for endogenous, tumor-specific T cells. *J. Exp. Med.* 200, 1581 (2004).
  227. T. Boon, J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, A. Van Pel, Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 337 (1994).
  228. P. van der Bruggen et al., A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643 (1991).
  229. S. J. Szabo, B. M. Sullivan, S. L. Peng, L. H. Glimcher, Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 713 (2003).
  230. K. E. de Visser, A. Eichten, L. M. Coussens, Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer* 6, 24 (2006).
  231. L. M. Coussens, Z. Werb, Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860 (2002).
  232. F. R. Greten et al., IKK $\beta$  Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. *Cell* 118, 285 (2004).
  233. D. Pardoll, T cells and tumours. *Nature* 411, 1010 (2001).
  234. D. Pardoll, Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu. Rev. Immunol.* 21, 807 (2003).

235. E. Pikarsky et al., NF- $\kappa$ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431, 461 (2004).
236. J. W. Pollard, Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 4, 71 (2004).
237. P. K. Baier et al., Analysis of the T cell receptor variability of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinomas. *Tumour Biol.* 19, 205 (1998).
238. A. C. Diederichsen, J. B. Hjelmberg, P. B. Christensen, J. Zeuthen, C. Fenger, Prognostic value of the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 52, 423 (2003).
239. Y. Naito et al., CD8<sup>+</sup> T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 58, 3491 (1998).
240. E. Sato et al., Intraepithelial CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8<sup>+</sup>/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 18538 (2005).
241. L. Zhang et al., Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 203 (2003).
242. F. Sallusto, J. Geginat, A. Lanzavecchia, Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 745 (2004).
243. F. Pages et al., Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 2654 (2005).
244. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early stage colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2009.
245. R. Salgado, C. Denkert, S. Demaria, N. Sirtaine, F. Klauschen, G. Pruneri, S. Wienert, G. Van den Eynden, F. L. Baehner, F. Penault-Llorca, E. A. Perez, E. A. Thompson, W. F. Symmans, A. L. Richardson, J. Brock, C. Criscitiello, H. Bailey, M. Ignatiadis, G. Floris, J. Sparano, Z. Kos, T. Nielsen, D. L. Rimm, K. H. Allison, J. S. Reis-Filho, S. Loibl, C. Sotiriou, G. Viale, S. Badve, S. Adams, K. Willard-Gallo, S. Loi. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015 Feb;26(2):259-71. doi: 10.1093/annonc/mdu450. Epub 2014 Sep 11.
246. Willard-Gallo K, Gu-Trantien C, Garaud S et al. Organized immune response in cancer. In: European Patent #12195271, 2012.
247. Vinayak S, Gray RJ, Adams S et al. Association of increased tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) with immunomodulatory (IM) triple-negative breast cancer (TNBC) subtype and response to neoadjuvant platinum-based therapy in PrECOG0105. *J Clin Oncol* 2014; 32: 5s. (suppl; abstr 1000).
248. Denkert C, Loibl S, Noske A et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 105–113.
249. Nobumoto Tomioka, Manabu Azuma, Mayuko Ikarashi, Mitsugu Yamamoto, Masako Sato, Ken-ichi Watanabe, Katsushige Yamashiro, Masato Takahashi. The therapeutic candidate for immune checkpoint inhibitors elucidated

- by the status of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed death ligand 1 (PD-L1) expression in triple negative breast cancer (TNBC). *Breast Cancer* 2018 Jan;25(1):34-42 doi: 10.1007/s12282-017-0781-0. Epub 2017 May 9.
250. Schalper KA, Brown J, Carvajal-Hausdorf D et al. Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Natl Cancer Inst* 2015 Feb 3;107(3):dju435. doi: 10.1093/jnci/dju435. Print 2015 Mar.
  251. Maryam Althobiti, Mohammed A Aleskandarany, Chitra Joseph, Michael Toss, Nigel Mongan, Maria Diez-Rodriguez, Christopher C Nolan, Ibraheem Ashankyty, Ian O Ellis, Andrew R Green & Emad A Rakha. Heterogeneity of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer and its prognostic significance. *Histopathology*. 2018 Dec;73(6):887-896. doi: 10.1111/his.13695. Epub 2018 Oct 9.
  252. Breast tumors - WHO Classification of Tumors Editorial Board. International Agency for Research on Cancer: Lyon; 2019.
  253. Fridman, W., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. and Galon, J. (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12: 298–306.
  254. Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Berger, A., Bindea, G., Meatchi, T. et al. (2011) Histopathologic based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 29: 610–618.
  255. Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Müller, B., Komor, M. et al. (2010) Tumor-Associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 28: 105–113.
  256. Mahmoud, S., Paish, E., Powe, D., Macmillan, R., Grainge, M., Lee, A. et al. (2011) Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 29: 1949–1955.
  257. Finak, G., Bertos, N., Pepin, F., Sadekova, S., Souleimanova, M., Zhao, H. et al. (2008) Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 14: 518–527.
  258. DeNardo, D., Brennan, D., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S., Madden, S. et al. (2011) Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discovery* 1: 54–67.
  259. Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C. et al. (2009) Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 15: 1170–1178.
  260. West, N., Milne, K., Truong, P., Macpherson, N., Nelson, B. and Watson, P. (2011) Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 13: R126.
  261. Stagg J and Allard B. Immunotherapeutic approaches in triple-negative breast cancer: latest research and clinical prospects. *Ther Adv Med Oncol*. 2013 May; 5(3): 169–181.
  262. Shah, S., Roth, A., Goya, R., Oloumi, A., Ha, G., Zhao, Y. et al. (2012) The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 486: 395–399.
  263. Stephens, P., Tarpey, P., Davies, H., Loo, P., Greenman, C., Wedge, D. et al. (2012) The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* 486: 400–404.
  264. Laura L. Carter et Al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4+ and CD8+ T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 2002 Mar;32(3):634-43

265. Ravetch, J. V. and Lanier, L. L., Immune inhibitory receptors. *Science*. 2000 Oct 6;290(5489):84-9.
266. Pardoll, Drew M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22;12(4):252-64.
267. Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, A. and Sharpe, A. H., Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *J Exp Med*. 1996 Aug 1; 184(2): 783–788.
268. Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K. P., Thompson, C. B., Griesser, H. and Mak, T. W., Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science*. 1995 Nov 10;270(5238):985-8
269. Siegel, R. M. and Fleisher, T. A., The role of Fas and related death receptors in autoimmune and other disease states. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 May;103(5 Pt 1):729-38
270. Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C. I., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Suda, T. and Nagata, S., Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*. 1994 Mar 25;76(6):969-76
271. Annett Schiwitza, Hans-Ulrich Schildhaus, Birgit Zwerger Monitoring efficacy of checkpoint inhibitor therapy in patients with non-small-cell lung cancer. *Immunotherapy*. 2019 Jun;11(9):769-782.
272. Adler AI et Al. NICE guidance on nivolumab with ipilimumab for untreated advanced renal cell carcinoma. *Lancet Oncol*. 2019 Jul;20(7):904-905.
273. Ken Saijo, Hiroo Imai, Kota Ouchi, Yoshinari Okada, Yuko Sato, Keigo Komine, Masahiro Takahashi. Therapeutic Benefits of Ipilimumab among Japanese Patients with Nivolumab-Refractory Mucosal Melanoma: A Case Series Study. *Tohoku J Exp Med*. 2019 May;248(1):37-43.
274. André Hennigs, Fabian Riedel, Adam Gondos, Peter Sinn, Peter Schrimacher, Frederik Marmé, Dirk Jager, Hans-Ulrich Kauczor, Anee Stieber, Katja Lindel. Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: a large prospective cohort study. *BMC Cancer*. 2016 Sep 15;16(1):734.
275. Dong H, Zhu G, Tamada K. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*. 1999 Dec;5(12):1365-9.
276. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000 Oct 2; 192(7): 1027–1034
277. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*. 2007 Mar;8(3):239-45
278. Eggermont Am, Spatz A, Rovert C. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 2014 Mar 1;383(9919):816-27.
279. Drosler RA, Hirt C, Viehl CIT. Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2013 Jun;49(9):2233-42.
280. Ghebh H, Mohammed S, Al-Omair A. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma. *Neoplasia*. 2006 Mar;8(3):190-8.
281. Bigelow E, Bever KM, Xu H. Immunohistochemical staining of B7-H1 (PD-L1) on paraffin-embedded slides of pancreatic adenocarcinoma tissue. *J Vis Exp*. 2013 Jan 3;(71):4059

282. Lin C, Chen X, Liu J. Advances of PD-1/PD-L1 signaling pathway in immune escape and treatment for non-small cell lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2014 Oct 20;17(10):734-40
283. Parra ER, Behrens C, Rodriguez-Canales J. Image analysis-based assessment of PD-L1 and tumor-associated immune cells density supports distinct intratumoral microenvironment groups in non-small cell lung carcinoma patients. *Clin Cancer Res*. 2016 Dec 15;22(24):6278-6289.
284. Edwin R Parra, P Villalobos, B Mino. Comparison of Different Antibody Clones for Immunohistochemistry Detection of Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) on Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018 Feb;26(2):83-93
285. W. Y. Sun, Y. K. Lee, J. S. Koo. Expression of PD-L1 in triple-negative breast cancer based on different immunohistochemical antibodies. *J Transl Med*. 2016 Jun 10;14(1):173.
286. Tejashree Karnik, Bruce F Kimler, Fang Fan. PD-L1 in breast cancer: comparative analysis of 3 different antibodies. *Hum Pathol*. 2018 Feb;72:28-34
287. Ossama Tawfik, Bruce F. Kimler, Tejashree Karnik, Clinichopathological correlation of PD-L1 in primary and metastatic breast cancer and infiltrating immune cells. *Hum Pathol*. 2018 Oct;80:170-178.
288. V.J. Weigman, H.H. Chao, A.A. Shabalin, X. He, J.S. Parker, S.H. Nordgard, T.Grushko, D. Huo, C. Nwachukwu, A. Nobel, V.N. Kristensen, A.L. Borresen-Dale, O.I. Olopade, C.M. Perou, Basal-like breast cancer DNA copy number losses identify genes involved in genomic instability, response to therapy, and patient survival, *Breast Cancer Research and Treatment* 133 (3) (2012)865–880.
289. H. Nogi, T. Kobayashi, M. Suzuki, I. Tabei, K. Kawase, Y. Toriumi, H. Fukushima, K. Uchida, EGFR as paradoxical predictor of chemosensitivity and outcome among triple-negative breast cancer, *Oncology Reports* 21 (2) (2009) 413–417.
290. G. Peiro, E. Adrover, L. Sanchez-Tejada, E. Lerma, M. Planelles, J. Sanchez-Paya, F.I. Aranda, D. Giner, F.J. Gutierrez-Avino, Increased insulin-like growth factor-1 receptor mRNA expression predicts poor survival in immunophenotypes of early breast carcinoma, *Modern Pathology* 24 (2) (2011) 201–208.
291. K. Rennstam, N. McMichael, P. Berglund, G. Honeth, C. Hegardt, L. Ryden, L.Luts, P.O. Bendahl, I. Hedenfalk, Numb protein expression correlates with a basal-like phenotype and cancer stem cell markers in primary breast cancer, *Breast Cancer Research and Treatment* 122 (2) (2010) 315–324.
292. M. Smid, M. Hoes, A.M. Sieuwerts, S. Sleijfer, Y. Zhang, Y. Wang, J.A. Foekens, J.W. Martens, Patterns and incidence of chromosomal instability and their prognostic relevance in breast cancer subtypes, *Breast Cancer Research and Treatment* 128 (1) (2011) 23–30.
293. E.A. Rakha, S.E. Elsheikh, M.A. Aleskandarany, H.O. Habashi, A.R. Green, D.G. Powe, M.E. El-Sayed, A. Benhasouna, J.S. Brunet, L.A. Akslen, A.J. Evans, R. Blamey, J.S. Reis-Filho, W.D. Foulkes, I.O. Ellis, Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes, *Clinical Cancer Research* 15 (7) (2009) 2302–2310.
294. S. Nofech-Mozes, M. Trudeau, H.K. Kahn, R. Dent, E. Rawlinson, P. Sun, S.A. Narod, W.M. Hanna, Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers, *Breast Cancer Research and Treatment* 118 (1) (2009) 131–137.

295. K.D. Voduc, M.C. Cheang, S. Tyldesley, K. Gelmon, T.O. Nielsen, H. Kennecke, Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse, *Journal of Clinical Oncology* 28 (10) (2010) 1684–1691.
296. X.R. Yang, J. Chang-Claude, E.L. Goode, F.J. Couch, H. Nevanlinna, R.L. Milne, M.Gaudet, M.K. Schmidt, A. Broeks, A. Cox, P.A. Fasching, R. Hein, A.B. Spurdle, et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies, *Journal of the National Cancer Institute* 103 (3) (2011) 250–263.
297. T. Islam, K. Matsuo, H. Ito, S. Hosono, M. Watanabe, H. Iwata, K. Tajima, H. Tanaka, Reproductive and hormonal risk factors for luminal, HER2-overexpressing, and triple-negative breast cancer in Japanese women, *Annals of Oncology* 23 (9) (2012) 2435–2441.
298. P. Xing, J. Li, F. Jin, A case–control study of reproductive factors associated with subtypes of breast cancer in Northeast China, *Medical Oncology* 27 (3) (2010) 926–931.
299. M.M. Gaudet, M.F. Press, R.W. Haile, C.F. Lynch, S.L. Glaser, J. Schildkraut, M.D. Gammon, W. Douglas Thompson, J.L. Bernstein, Risk factors by molecular subtypes of breast cancer across a population-based study of women 56 years or younger, *Breast Cancer Research and Treatment* 130 (2) (2011) 587–597.
300. J.M. Olefsky, Nuclear receptor minireview series, *The Journal of Biological Chemistry* 276 (40) (2001) 36863–36864.
301. A.O. Brinkmann, Molecular mechanisms of androgen action—a historical perspective, *Methods in Molecular Biology* 776 (2011) 3–24.
302. C.J. Ryan, D.J. Tindall, Androgen receptor rediscovered: the new biology and targeting the androgen receptor therapeutically, *Journal of Clinical Oncology* 29 (27) (2011) 3651–3658.
303. M.E. Lippman, G. Bolan, K. Huff, Human breast cancer responsive to androgen in long term tissue culture, *Nature* 258 (5533) (1975) 339–341.
304. H. Flax, H. Salih, K.A. Newton, J.R. Hobbs, Are some women’s breast cancers androgen dependent? *Lancet* 1 (7814) (1973) 1204–1207.
305. M.M. Brentani, E.L. Franco, C.T. Oshima, M.M. Pacheco, Androgen, estrogen, and progesterone receptor levels in malignant and benign breast tumors: a multivariate analysis approach, *International Journal of Cancer* 38 (5) (1986) 637–642.
306. J.A. Soreide, O.A. Lea, J.E. Varhaug, A. Skarstein, S. Kvinnsland, Androgen receptors in operable breast cancer: relation to other steroid hormone receptors, correlations to prognostic factors and predictive value for effect of adjuvant tamoxifen treatment, *European Journal of Surgical Oncology* 18 (2) (1992) 112–118.
307. S.N. Birrell, J.M. Bentel, T.E. Hickey, C. Ricciardelli, M.A. Weger, D.J. Horsfall, W.D. Tilley, Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 52 (5) (1995) 459–467.
308. R.E. Hall, J.A. Clements, S.N. Birrell, W.D. Tilley, Prostate-specific antigen and gross cystic disease fluid protein-15 are co-expressed in androgen receptor positive breast tumours, *British Journal of Cancer* 78 (3) (1998) 360–365.
309. R.E. Hall, J.O. Aspinall, D.J. Horsfall, S.N. Birrell, J.M. Bentel, R.L. Sutherland, W.D. Tilley, Expression of the androgen receptor and an androgen-responsive protein, apolipoprotein D, in human breast cancer, *British Journal of Cancer* 74 (8) (1996) 1175–1180.

310. F. Moinfar, M. Okcu, O. Tsybrovskyy, P. Regitnig, S.F. Lax, W. Weybora, M. Ratschek, F.A. Tavassoli, H. Denk, Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas: potential relevance to new therapeutic strategies, *Cancer* 98 (4) (2003) 703–711.
311. J.J. Isola, Immunohistochemical demonstration of androgen receptor in breast cancer and its relationship to other prognostic factors, *The Journal of Pathology* 170 (1) (1993) 31–35.
312. V. Kuenen-Boumeester, T.H. Van der Kwast, W.L. van Putten, C. Claassen, B. van Ooijen, S.C. Henzen-Logmans, Immunohistochemical determination of androgen receptors in relation to oestrogen and progesterone receptors in female breast cancer, *International Journal of Cancer* 52 (4) (1992) 581–584.
313. O.A. Lea, S. Kvinnsland, T. Thorsen, Improved measurement of androgen receptors in human breast cancer, *Cancer Research* 49 (24 Pt 1) (1989) 7162–7167.
314. R. Hu, S. Dawood, M.D. Holmes, L.C. Collins, S.J. Schnitt, K. Cole, J.D. Marotti, S.E. Hankinson, G.A. Colditz, R.M. Tamimi, Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women, *Clinical Cancer Research* 17 (7) (2011) 1867–1874.
315. Shristi Bhattarai , Sergey Klimov , Karuna Mittal , Uma Krishnamurti , Xiaoxian Bill Li, Gabriela Oprea-Ilie, Ceyda Sonmez Wetherilt, Ansa Riaz, Mohammed A Aleskandarany, Andrew R Green, Ian O Ellis, Guilherme Cantuaria, Meenakshi Gupta, Upender Manne, Johnson Agboola, Brett Baskovich, Emiel A M Janssen, Grace Callagy , Elaine M Walsh, Anurag Mehta, Atika Dogra, Tanuja Shet, Pooja Gajaria, Tiffany Traina, Haruna A Nggada, Abidemi Omonisi, Saad A Ahmed, Emad A Rakha, Padmashree Rida, Ritu Aneja. Prognostic Role of Androgen Receptor in Triple Negative Breast Cancer: A Multi-Institutional Study. *Cancers* (Basel). 2019 Jul 17;11(7):995. doi: 10.3390/cancers11070995
316. Masuda, H., Baggerly, K.A., Wang, Y., Zhang, Y., Gonzalez-Angulo, A.M., Meric-Bernstam, F., Valero, V., Lehmann, B.D., Pietenpol, J.A., Hortobagyi, G.N., Symmans, W.F., Ueno, N.T., 2013. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triplenegative breast cancer molecular subtypes. *Clin. Cancer Res.* 19. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0799>.
317. Gucalp, A., Tolane, S., Isakoff, S.J., Ingle, J.N., Liu, M.C., Carey, L.A., Blackwell, K., Rugo, H., Nabell, L., Forero, A., Stearns, V., Doane, A.S., Danso, M., Moynahan, M.E., Momen, L.F., Gonzalez, J.M., Akhtar, A., Giri, D.D., Patil, S., Feigin, K.N., Hudis, C.A., Traina, T.A., 2013. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor positive, estrogen receptor-negative metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 19, 5505–5512. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3327>.
318. Arce-Salinas, C., Riesco-Martinez, M.C., Hanna, W., Bedard, P., Warner, E., 2016. Complete response of metastatic androgen receptor-positive breast cancer to bicalutamide: case report and review of the literature. *J. Clin. Oncol.* 34, e21–e24. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.49.8899>.
319. Traina, T.A., Miller, K., Yardley, D.A., Eakle, J., Schwartzberg, L.S., O'Shaughnessy, J., Gradishar, W., Schmid, P., Winer, E., Kelly, C., Nanda, R., Gucalp, A., Awada, A., Garcia-Estevez, L., Trudeau, M.E., Steinberg, J., Uppal, H., Tudor, I.C., Peterson, A., Cortes, J., 2018. Enzalutamide for the {treatment} of {androgen} {Receptor}-{Expressing} {Triple}-{Negative} {breast} {cancer}. *J. Clin. Oncol.* 36, 884–890. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.3495>.
320. O'Shaughnessy, J., Campone, M., Brain, E., Neven, P., Hayes, D., Bondarenko, I., Griffin, T.W., Martin, J., De Porre, P., Kheoh, T., Yu, M.K., Peng, W., Johnston,

- S., 2016. Abiraterone acetate, exemestane or the combination in postmenopausal patients with estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* 27, 106–113. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv487>.
321. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 22: 207–219
  322. Allison, K. H., Hammond, M. E. H., Dowsett, M., McKernin, S. E., Carey, L. A., Fitzgibbons, P. L., Hayes, D. F., Lakhani, S. R., Chavez-MacGregor, M., Perlmutter, J., Perou, C. M., Regan, M. M., Rimm, D. L., Symmans, W. F., Torlakovic, E. E., Varella, L., Viale, G., Weisberg, T. F., McShane, L. M., & Wolff, A. C. (2020). Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: ASCO/CAP guideline update. *Journal of Clinical Oncology*, 38(12), 1346-1366. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02309>.
  323. Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, Seftor REB. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 2003 Jun;3(6):411-21. doi: 10.1038/nrc1092.
  324. Seymour L, Bezwoda WR. Positive immunostaining for platelet derived growth factor (PDGF) is an adverse prognostic factor in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1994;32(2):229-33. doi: 10.1007/BF00665774.
  325. Paulsson J, Rydén L, Strell C, Frings O, Tobin NP, Fornander T, Bergh J, Landberg G, Stål O, Östman A. High expression of stromal PDGFR $\beta$  is associated with reduced benefit of tamoxifen in breast cancer. *J Pathol Clin Res* 2016 Sep 14;3(1):38-43. doi: 10.1002/cjp2.56. eCollection 2017 Jan.
  326. Ricciardi GRR, Adamo B, Ieni A, Licata L, Cardia C, Ferraro F, Franchina T, Tuccari G, Adamo V. Androgen Receptor (AR), E-Cadherin, and Ki-67 as Emerging Targets and Novel Prognostic Markers in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) Patients. *PLoS One* 2015 Jun 3;10(6):e0128368. doi: 10.1371/journal.pone.0128368. eCollection 2015.
  327. Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Palla SL, Carey M, Agarwal R, Meric-Berstam F, et al. Androgen receptor levels and association with PIK3CA mutations and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(7):2472–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1763 PMID: 19276248
  328. Pristauz G, Petru E, Stacher E, Geigl JB, Schwarzbraun T, Tsybrovskyy O, et al. Androgen receptor expression in breast cancer patients tested for BRCA1 and BRCA2 mutations. *Histopathology.* 2010; 57 (6):877–84. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03724.x PMID: 21166701
  329. He J, Peng R, Yuan Z, Wang S, Peng J, Lin G, et al. Prognostic value of androgen receptor expression in operable triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray. *Med Oncol.* 2012; 29(2):406–10. doi: 10.1007/s12032-011-9832-0 PMID: 21264529
  330. Yu KD, Zhu R, Zhan M, Rodriguez AA, Yang W, Wong S, et al. Identification of prognosis-relevant subgroups in patients with chemoresistant triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2013; 19 (10):2723–33. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2986 PMID: 23549873.
  331. Vera-Badillo FE, Templeton AJ, de Gouveia P, Diaz-Padilla I, Bedard PL, Al-Mubarak M, et al. Androgen receptor expression and outcomes in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2014; 106(1):djt319.
  332. Adamo B, Ricciardi GRR, Ieni A, Franchina T, Fazzari C, Sanò MV, Angelico G, Michele C, Tuccari G, Adamo V. The prognostic significance of combined androgen receptor, E-Cadherin, Ki67 and CK5/6 expression in patients



with triple negative breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Aug 16;8(44):76974-76986. doi: 10.18632/oncotarget.20293. eCollection 2017 Sep 29.