



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di ricerca in Oncologia e Chirurgia Sperimentali

Dipartimento di Medicina di Precisione in Area Medica, Chirurgica e Critica (Me.Pre.C.C.)

*Risposta immunitaria locale e sistemica nell' iter terapeutico del cancro ovarico
sottoposto a primary debulking surgery e interval debulking surgery*

Doctoral Dissertation of:
Mariano Catello Di Donna

Tutor:
Prof. Vito Chiantera

The Chair of the Doctoral Program:
Prof. Antonio Russo

2023/2024 –36° ciclo

Sommario

<i>Abstract</i>	2
<i>Sommario</i>	3
1. IL CARCINOMA OVARICO	4
1.1 Epidemiologia	4
1.2 Classificazione Istopatologica e biologia molecolare	5
1.3 Carcinoma sieroso di alto grado	6
2 MICROAMBIENTE TUMORALE E CANCER IMMUNOEDITING	9
2.1 Cancro: dall'oligoclonalità alla multicellularità.....	9
2.2 Il microambiente tumorale	10
2.3 Dall'immunosorveglianza all'escape dal Sistema Immunitario: l'immunoediting tumorale	11
2.4 Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs).....	13
2.4.1 Linfociti T	14
2.4.2 Linfociti NK	17
2.4.3 Linfociti B	18
2.4.4 PD-1 e PD-L1	19
2.4.5 Rapporto neutrofili/linfociti (NLR) come nuovo indice prognostico nei tumori.....	21
3 SCOPO DELLO STUDIO	22
3.1 Scopo dello studio	22
3.2 Disegno dello studio.....	23
4 Materiali e Metodi	27
4.1 Citometria a flusso multiparametrica	27
4.2 Prelievo di sangue periferico.....	28
4.2.1 Marcatura con gli anticorpi monoclonali.....	28
4.2.2 Acquisizione e strategia di gating.....	31
4.3 Colorazione immunoistochimica e analisi quantitativa	37
4.4 Popolazione in studio	37
5 RISULTATI	39
5.1 Coorte	39
5.2 Caratterizzazione linfocitaria del sangue periferico (PB) di pazienti con carcinoma ovarico.....	40
5.3 Caratterizzazione dell'infiltrato linfocitario nelle biopsie tumorali.....	52
5.4 Analisi di sopravvivenza.....	54
6 DISCUSSIONE	58
7 CONCLUSIONE	64
BIBLIOGRAFIA	65

Abstract

Background: L'obiettivo di questo studio è di eseguire un'analisi qualitativa e quantitativa delle sottopopolazioni cellulari immunitarie a livello sistemico e locale durante il percorso di trattamento in pazienti con carcinoma ovarico avanzato. Sono state valutate le variazioni cellulari e l'associazione con gli outcomes di sopravvivenza.

Materiali e Metodi: Abbiamo arruolato 67 pazienti, 35 sottoposte a chirurgia in upfront (gruppo PDS) e 32 a chemioterapia neoadiuvante e successiva chirurgia di intervallo (gruppo IDS). È stato prelevato un campione ematico e uno tumorale alla diagnosi e a determinati check point prestabiliti, durante l'iter terapeutico. La citometria a flusso e l'immunoistochimica sono state utilizzate per misurare sottoinsiemi di linfociti periferici e nel microambiente tumorale.

Risultati: Alla diagnosi, tutte le sottopopolazioni linfocitarie risultano prevalentemente al di fuori dei range di normalità. Nei prelievi successivi in entrambi i gruppi, i valori rientrano nella maggior parte dei casi nei range di normalità. Nel gruppo PDS, le variazioni dopo chirurgia dei linfociti T CD3+, CD4+, CD8+, cellule NK e monociti sono statisticamente significative (p -value: $< 0,01$). Le variazioni di CD3+, CD8+ e cellule NK correlano con un aumento della OS (p -value: $< 0,05$). All'univariata un basso PI laparoscopico correla con tali variazioni. Nel gruppo IDS esiste una variazione significativa nei linfociti T CD4+ (p -value: $< 0,006$) e CD8+ (p -value: $< 0,007$) e questa correla con un aumento della DFS. All'univariata un basso CA 125 post NACT correla con tali variazioni. La variazione del rapporto CD4+/CD8+ risulta significativa nel gruppo IDS (p -value di 0,04). Risulta significativo anche l'aumento percentuale di PD-1 nel gruppo PDS e la diminuzione di T-reg nelle IDS. La diminuzione del rapporto neutrofililinfociti (NLR) risulta significativo sia nelle PDS (p value: 0,007) che nelle IDS ma solo dopo chirurgia d'intervallo (p value: 0,04). Nessuno di questi biomarcatori correla con un aumento della OS e DFS. L'immunoistochimica delle biopsie tumorali, mostra una maggiore presenza di linfociti CD4+, CD8+ e CD163+. Le variazioni dei valori medi percentuali nelle biopsie tumorali pre e post chemioterapia, mostrano un aumento significativo dei linfociti CD8+ (p -value: 0,05), e una diminuzione significativa dei macrofagi CD 163+ (p -value: $< 0,01$), solo un aumento di CD8+ correla con un aumento della DFS.

Conclusioni: L'azione locale della rimozione completa del carico tumorale, soprattutto dopo chirurgia sia in entrambi i gruppi determina un effetto positivo sull'azione immunitaria antitumorale sistemica, "rigenerando" le cellule immunitarie. Le pazienti con un valore più basso del PI laparoscopico alla diagnosi nelle PDS e una diminuzione del CA 125 post chemioterapia neoadiuvante hanno una maggiore riattivazione del sistema immunitario.

Parole Chiave: cancro ovarico; ginecologia oncologica; tumor infiltrating lymphocyte; linfociti nel sangue periferico; risposta immunitaria;

Sommario

In questo studio di tesi ci si è concentrati sulla caratterizzazione, in citometria a flusso multiparametrica delle cellule immunitarie presenti nel circolo ematico e sulla caratterizzazione in immunohistochimica, delle cellule immunitarie presenti nel microambiente tumorale di pazienti con carcinoma ovarico; in particolare si è posta l'attenzione sui linfociti infiltranti il tumore (TILs). Sono state valutate le modifiche nelle concentrazioni delle diverse popolazioni linfocitarie nel corso dell'iter diagnostico-terapeutico del trattamento delle pazienti affette da carcinoma ovarico avanzato di alto grado, esaminando prelievi ematici e tissutali, prelevati in timing diversi durante le diverse fasi di cura.

Dapprima sono stati esposti gli aspetti generali del carcinoma ovarico. È stata posta attenzione anche alla classificazione istopatologica e alla biologia molecolare dei vari istotipi di carcinoma ovarico, focalizzandoci sugli istotipi più frequenti, i sierosi ed endometriodi di alto grado.

Successivamente, dopo un'attenta disamina della letteratura del settore, è stato studiato il rapporto che intercorre tra le cellule circolanti del sistema immunitario e i linfociti infiltranti il tumore (TILs), le loro variazioni durante l'iter di trattamento, e il tumore stesso. È stato osservato che la densità di alcune sottopopolazioni cellulari variano in maniera significativa durante il percorso di trattamento e correlano con una prognosi favorevole. Tuttavia, è stato anche evidenziato che molteplici sono i meccanismi di resistenza che si generano, come ad esempio l'attivazione di numerosi *pathway*, gli *immune checkpoint*, e che in maniera attiva contribuiscono all'evasione dalla risposta immunitaria dell'ospite.

Sono stati poi descritti i principi sui quali si basa la citometria a flusso, una tecnica di laboratorio che si rende particolarmente efficace per caratterizzare, in tempi relativamente brevi, un numero elevatissimo di cellule sospese in un mezzo fluido con risultati affidabili e ripetibili. Nella sezione materiali e metodi sono state descritte le procedure tecniche di analisi dei campioni biologici sia in citofluorimetria che all'immunohistochimica (biopsie tumorali).

Infine, sono stati analizzati i dati ottenuti in questo studio di tesi, i quali sono stati successivamente confrontati con i dati di letteratura, in modo tale da avere nuove informazioni circa le caratteristiche del microambiente tumorale del carcinoma ovarico.

1. IL CARCINOMA OVARICO

1.1 Epidemiologia

Il cancro ovarico è il tumore ginecologico più letale ed è considerato uno dei “big killers” tra le neoplasie femminili più diffuse. I dati del GLOBOCAN hanno riportato 313.959 nuovi casi di carcinoma ovarico e 207.252 morti per questa neoplasia nel 2020 nel mondo, mostrando che il tumore ovarico rappresenta il 3,4% circa di tutti i tumori femminili, con un’incidenza maggiore nei paesi a reddito alto e molto alto (7,1%) rispetto ai Paesi a reddito medio e basso (5,8%).¹ L’Associazione Italiana di Oncologia (AIOM) in collaborazione con l’Associazione Italiana dei Registri Tumori (AIRTUM) hanno calcolato che nel nostro paese vi sono stati 5.200 nuovi casi di tumore ovarico nel 2020². Il rischio nel corso della vita di una donna di sviluppare il cancro ovarico è di 1 su 75 e la sua probabilità di morire a causa della malattia è di 1 su 100.³

Il cancro dell’ovaio rappresenta la quinta causa di morte per cancro nelle donne. L’alto tasso di mortalità associato a questo tumore è attribuibile a molti fattori tra cui: una crescita asintomatica del tumore, l’insorgenza ritardata dei sintomi, i quali sono aspecifici, e l’assenza di strategie di *screening* validate che consentano di effettuare una diagnosi precoce (eccetto per le donne con alterazioni dei geni BRCA1 e BRCA2)^{3,4}.

Circa il 70-80% delle pazienti presenta, infatti, già alla prima diagnosi una malattia in stadio avanzato con disseminazione intraperitoneale (Stadio FIGO III-IV). Per questo gruppo di pazienti, il tasso di sopravvivenza a 5 anni si aggira intorno al 39-59% per gli stadi III e 17% per gli stadi IV⁵.

Il 90% dei tumori ovarici maligni è diagnosticato in donne in età superiore ai 40 anni (45-65 anni).

L’incidenza delle neoplasie maligne ovariche mostra un’ampia variazione geografica, i più alti tassi di incidenza aggiustati per età si osservano nei paesi più sviluppati del mondo, tra cui il Nord America e l’Europa centrale e orientale, dove si registrano 15 nuovi casi all’anno per 100.000 donne. I tassi sono intermedi in Sud America, (5,8 nuovi casi per 100.000 donne), e più bassi nei paesi africani e nel sud-est asiatico dove si osservano meno di 2 nuovi casi all’anno per 100.000 donne.^{6,7,8}

1.2 Classificazione Istopatologica e biologia molecolare

Il termine “cancro ovarico” identifica un gruppo eterogeneo di tumori maligni che differiscono per caratteristiche essenziali di eziologia, patogenesi, prognosi, patologia e patologia molecolare.⁹ Oltre il 90% dei tumori ovarici maligni è di origine epiteliale, il 5%-6% dei tumori costituisce tumori stromali dei cordoni sessuali (tumori delle cellule della granulosa, tecomi, ecc.) e il 2%-3% sono tumori a cellule germinali (teratomi, disgerminomi, ecc.).⁶

I tumori epiteliali maligni (carcinomi) sono i tumori ovarici più comuni e anche quelli più letali. Rappresentano un gruppo eterogeneo di neoplasie con differenti caratteristiche morfologiche e biologiche pur derivando tutti dall'epitelio di superficie ovarico, il quale è istologicamente simile al mesotelio, che è l'epitelio che riveste l'interno delle cavità pelviche e addominali. Sono attualmente identificati cinque gruppi principali di carcinomi ovarici epiteliali (figura 1): carcinoma sieroso di alto grado (70%), carcinoma endometroide (10%), carcinoma a cellule chiare (10%), carcinoma mucinoso (3%), carcinoma sieroso di basso grado (<5%). Questi tumori sono malattie intrinsecamente diverse, con differenze nei fattori di rischio epidemiologici e genetici, nelle alterazioni genetiche molecolari, nella risposta alla chemioterapia e nella prognosi.

L'origine dei tumori epiteliali dell'ovaio è, al momento, irrisolta. Il motivo risiede nel fatto che molti tumori vengono individuati relativamente tardi, interferendo con l'identificazione di una lesione precancerosa.⁸

Attualmente l'ipotesi patogenetica più accreditata prevede che i carcinomi originino da una trasformazione neoplastica delle cellule staminali embrionali dell'epitelio ovarico di superficie.⁷ Tuttavia, vi sono anche prove convincenti che un certo numero di tumori ritenuti tumori ovarici primari in realtà abbiano origine in altri organi pelvici e coinvolgano secondariamente l'ovaio.^{8,10}

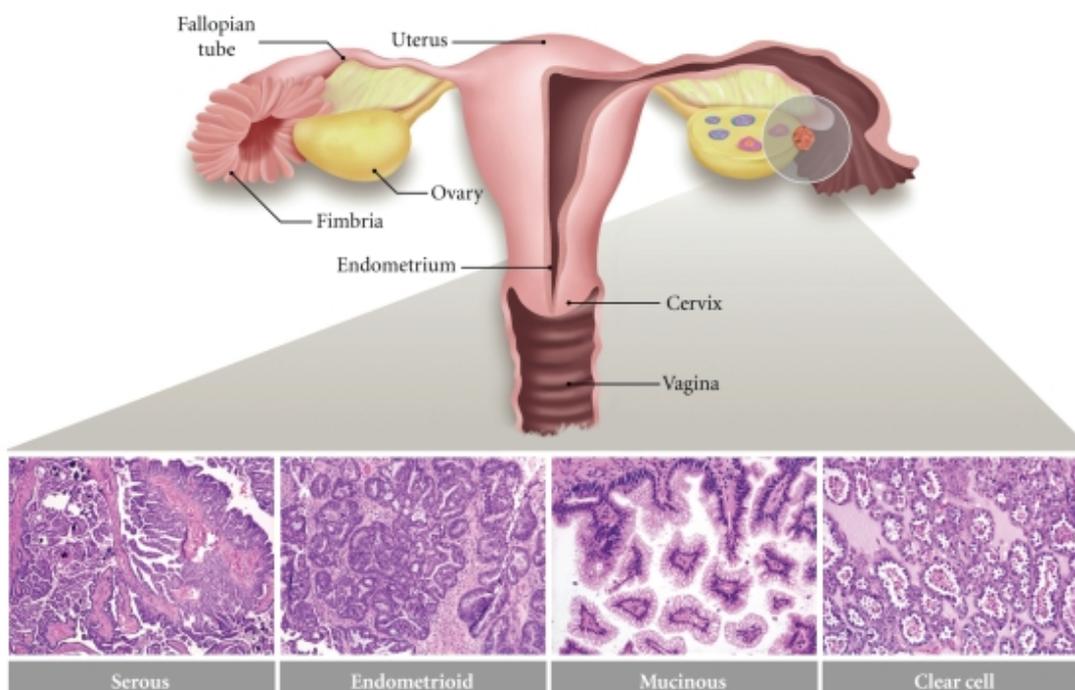


Figura 1. I principali sottotipi istologici di carcinoma ovarico⁷⁷

1.3 Carcinoma sieroso di alto grado

Il carcinoma sieroso di alto grado (HGSC) rappresenta l'istotipo più comune di carcinoma ovarico e, nella maggioranza dei casi (circa l'80%), si presenta in stadio avanzato. Il coinvolgimento bilaterale delle ovaie si osserva in circa 2/3 dei casi e le neoplasie limitate alle ovaie sono molto rare (<10%). Le dimensioni medie di questa neoplasia risultano spesso inferiori a quelle osservate negli altri carcinomi ovarici, ma, in ogni caso, il carcinoma sieroso di alto grado mostra usualmente una maggiore propensione alla disseminazione extraovarica, diffondendosi alle superfici peritoneali, e al coinvolgimento estensivo dell'omento. Queste neoplasie, inoltre, sono comunemente associate alla presenza di ascite.^{7,8,10}

Il profilo immunohistochimico dei tumori sierosi di alto grado prevede una positività per p53, WT1, p16, BRCA1 e per i recettori estrogenici-progestinici.

Sotto il profilo genetico, i carcinomi sierosi ad alto grado presentano un'elevata frequenza di mutazioni nel gene TP53 ma non presentano mutazioni né del gene KRAS né del gene BRAF. Le mutazioni TP53 sono state identificate in quasi tutti i tumori (96%). Questo tipo di carcinomi presentano anche mutazioni *germline* di BRCA1 e/o BRCA2. Le donne con mutazioni *germline* di BRCA1 o BRCA2 presentano un rischio variabile dal 30% al 70% di sviluppare un carcinoma ovarico nel corso della vita e, per tale motivo, viene spesso

proposta in queste donne l'annessiectomia bilaterale profilattica.⁷ Oltre alla mutazione *germline*, l'inattivazione della via BRCA può derivare da mutazioni somatiche in BRCA1 o BRCA2 o dall'ipermetilazione del promotore in BRCA1 e perdita di espressione. Tutti questi cambiamenti si verificano all'inizio dell'oncogenesi e provocano la perdita della capacità di riparare le rotture del doppio filamento del DNA, che a sua volta porta all'instabilità cromosomica. Un attento esame di questi tumori ha suggerito che una significativa percentuale di tumori correlati a BRCA1 e BRCA2 si origina dall'epitelio di rivestimento della fimbria della tuba di Falloppio.^{7,8,10,11}

Crescenti dati in letteratura dimostrano che il controllo della diffusione tumorale da parte dell'ospite dipende dall'attivazione del sistema immunitario che stabilisce un equilibrio con le cellule cancerogene. Il peritoneo rappresenta una membrana sierosa mesoteliale che costituisce la struttura di rivestimento delle pareti della cavità addominale e tra le sue varie funzioni svolge anche un ruolo immunitario complesso nell'attivazione della risposta immunitaria ed infiammatoria essendo caratterizzato da un complesso e diffuso infiltrato linfo-monocitario che viene prontamente attivato in caso di risposta contro l'ospite¹². Da un punto di vista oncologico costituisce una frequente sede di localizzazione metastatica nelle pazienti con carcinoma ovarico configurando un quadro cosiddetto di carcinosi peritoneale (*peritoneal carcinosis - PC*). Il trattamento standard delle pazienti affette da cancro ovarico avanzato con PC è basato sulla chirurgia di debulking primaria (*primary debulking surgery - PDS*), generalmente seguita da chemioterapia adiuvante a base di platino^{13,14}. L'obiettivo principale del trattamento chirurgico è l'asportazione di tutta la malattia macroscopicamente visibile (debulking completo). Viceversa, nei casi di malattia non citoriducibile in UP-FRONT è possibile eseguire una chemioterapia in regime neoadiuvante (*neoadjuvant chemotherapy - NACT*) e successivamente eseguire una chirurgia di intervallo (*interval debulking surgery - IDS*)^{15,16}. Il debulking chirurgico, basato sull'asportazione di tutta la malattia macroscopicamente visibile, impone uno sforzo chirurgico ultraradicale con un approccio di tipo laparotomico multiquadrante. Una citoriduzione ottimale rappresenta la pietra angolare nel trattamento del cancro ovarico, fornendo non solo un maggior tasso di risposta ottimale alla chemioterapia postoperatoria e quindi dei chiari vantaggi in termini di *disease free survival (DFS)* e *overall survival (OS)*, ma anche una riduzione dei sintomi correlati alla malattia e un miglioramento della qualità della vita. Tutto questo si riflette anche in un possibile miglioramento della risposta immunitaria dell'ospite mediante la rimozione di citochine immunosoppressive^{17,18}. Infine, il trattamento

adiuvante del cancro ovarico di solito consiste in combinazione di chemioterapia a base di platino. Nonostante quanto esposto sino ad ora, i tassi di recidiva sono comunque molto elevati aggirandosi intorno al 70% a due anni dalla fine del trattamento. È quindi essenziale identificare dei fattori prognostici positivi che possano predire i tassi di sopravvivenza di queste pazienti e che possano indirizzare verso la corretta scelta terapeutica. In un'analisi su larga scala di pazienti con cancro ovarico in stadio III trattati con la terapia raccomandata, l'età, l'istologia del tumore e residuo tumorale al termine della chirurgia citoreducente rappresentano fattori prognostici positivi predittivi indipendenti^{19,20}.

Oltre a questi fattori certi, negli ultimi anni, è stato dimostrato che anche la presenza di linfociti infiltranti il tumore (TILs) rappresentano un fattore predittivo positivo per la sopravvivenza globale, suggerendo un probabile ruolo funzionale dei linfociti T sul controllo nella progressione del cancro ovarico.

Il ruolo della risposta immunitaria nel cancro ovarico è tutt'oggi argomento di numerosi studi. Il sistema immunitario non è in grado di riconoscere o eliminare le cellule neoplastiche perché, a differenza di virus o batteri riconosciuti come agenti estranei, sono considerate comunque come "self". Ciononostante, evidenze scientifiche mostrano chiaramente come topi immunodeficienti sono molto più suscettibili a sviluppare una malattia metastatica, lasciando comprendere che l'immunità adattativa è fondamentale per il controllo della crescita tumorale²¹.

2 MICROAMBIENTE TUMORALE E *CANCER IMMUNOEDITING*

2.1 Cancro: dall'oligoclonalità alla multicellularità

Tutti i tumori, salvo qualche rarissima eccezione, hanno un'origine monoclonale. L'intera popolazione di cellule neoplastiche all'interno di un tumore deriva da una singola cellula che ha subito nel proprio genoma una o più mutazioni o anche alterazioni epigenetiche (fenomeno dell'iniziazione). Quando la cellula "iniziata" comincia a moltiplicarsi (fenomeno della promozione) forma una progenie, che costituisce la popolazione cellulare neoplastica, la quale, pur avendo un'origine monoclonale, risulta nel suo complesso eterogenea in quanto ogni cellula che la costituisce può andare incontro ad altre mutazioni, alcune delle quali possono determinare nella cellula colpita l'acquisizione di un vantaggio replicativo con la conseguenza che, nel contesto della popolazione neoplastica, si manifesta la progressiva comparsa di numerosi subcloni, generalmente forniti, nei tumori maligni, di caratteristiche di maggiore aggressività (fenomeno della progressione).^{8,22}

Il tumore si comporta, quindi, come un'entità dinamica.

È noto che la persistenza dei tumori, anche quando lo stimolo scatenante è terminato, derivi dalle alterazioni genetiche ereditabili che vengono trasmesse alla progenie delle cellule tumorali. Queste modificazioni genetiche permettono l'eccessiva e sregolata proliferazione che diventa autonoma (ossia indipendente dagli stimoli fisiologici di crescita), sebbene i tumori rimangano in genere dipendenti dall'ospite per la nutrizione e l'apporto ematico.⁸

L'autonomia moltiplicativa delle cellule tumorali deriva dalla riduzione o perdita della proprietà di sottostare ai meccanismi regolatori della proliferazione cellulare e/o dalla riduzione o perdita della possibilità di andare incontro a morte cellulare programmata, con la conseguenza che anche la sopravvivenza comporta l'incremento numerico delle cellule che possono replicarsi.²²

Allo sviluppo del tumore concorrono, oltre alle alterazioni genomiche anche una serie di altri fattori di cui alcuni sono endogeni, ad esempio la riduzione della capacità differenziativa, ed altri sono generati da altre cellule dell'organismo che ospita la neoplasia.

22

Un tumore non è semplicemente un gruppo di cellule tumorali ma piuttosto un insieme eterogeneo di cellule. Il cancro può essere, quindi, definito come un'entità multicellulare, costituita da cellule di diversa derivazione tissutale e fenotipica. Tutti i tumori contengono una popolazione diversificata di cellule: cellule neoplastiche nonché altri tipi cellulari che

vengono attivati e/o reclutati *in loco*, ad esempio fibroblasti, cellule immunitarie innate e cellule immunitarie adattive e cellule che rivestono i vasi sanguigni e linfatici. Queste cellule interagendo le une con le altre e con la matrice extracellulare (ECM), caratterizzano uno specifico microambiente, in cui il rilascio di molecole solubili garantisce la sopravvivenza delle cellule tumorali, favorendo la cancerogenesi.^{23,24}

In tale contesto quindi, il sistema immunitario, insieme col restante microambiente, gioca un ruolo cruciale nel determinare la sorte delle cellule tumorali in via di sviluppo.

2.2 Il microambiente tumorale

Negli ultimi anni è stata data attenzione al concetto di microambiente tumorale nel tentativo di descrivere e prevedere meglio le caratteristiche fenotipiche del cancro. Il microambiente all'interno del quale si sviluppa e cresce il tumore è un ambiente molto dinamico ed eterogeneo, il quale subisce numerosi cambiamenti nel corso dello sviluppo del tumore influenzando l'evoluzione del cancro stesso. Si ritiene che il microambiente tumorale non sia solo un osservatore silenzioso, ma piuttosto un promotore attivo della progressione del cancro. Tra i costituenti del microambiente tumorale vi sono cellule linfoidi e/o mieloidi, nonché fibroblasti, cellule vascolari, vasi linfatici nonché la matrice extracellulare (ECM) che lo circonda. All'inizio della crescita del tumore, si sviluppa una relazione dinamica e reciproca tra le cellule tumorali e i componenti del microambiente tumorale che supporta la sopravvivenza delle cellule tumorali, l'invasione locale e la disseminazione metastatica.^{25,26} I tumori si infiltrano con diverse cellule immunitarie adattative e innate che possono svolgere funzioni sia pro-tumorali che antitumorali. Queste cellule immunitarie sono componenti critici del microambiente tumorale in quanto possono sopprimere la crescita del tumore o promuoverla. Gli infiltrati leucocitari possono variare in dimensioni e composizione da tumore a tumore, la loro presenza è stata considerata come prova che l'ospite non ignora il tumore in via di sviluppo, ma piuttosto tenta di interferire con la progressione del tumore stesso. Tuttavia, nonostante varie cellule effettrici immunitarie vengano reclutate nel sito tumorale, le loro funzioni antitumorali sono sotto regolate, quindi, le cellule immunitarie nel microambiente tumorale non solo non riescono a esercitare le funzioni effettrici antitumorali, ma sono cooptate per promuovere la tumorigenesi. Il risultato è la fuga del tumore dal sistema immunitario dell'ospite attraverso l'attivazione di uno o più meccanismi molecolari che portano all'inibizione delle funzioni delle cellule immunitarie o all'apoptosi delle cellule effettrici antitumorali. Quindi, il tumore

non solo riesce a sfuggire al sistema immunitario dell'ospite, ma riesce efficacemente a trarre vantaggio dall'infiltrazione delle cellule modificando le loro funzioni per creare il microambiente favorevole alla progressione del tumore. Il microambiente tumorale è, quindi, un ambiente unico che emerge nel corso della progressione del tumore come risultato delle sue interazioni con l'ospite. Viene in ogni momento modellato e dominato dal tumore, che orchestra eventi molecolari e cellulari che si verificano nei tessuti circostanti.^{27,28} Il contesto immunitario del microambiente tumorale, determinato dalla densità, composizione, organizzazione e stato funzionale dell'infiltrato leucocitario può fornire informazioni rilevanti per la prognosi delle neoplasie.²⁹

2.3 Dall'immunosorveglianza all'escape dal Sistema Immunitario: l'immunoediting tumorale

Per evitare l'attacco del sistema immunitario, le cellule tumorali sviluppano diverse strategie per sfuggire alla sorveglianza immunitaria. Il concetto di *immunoediting* del cancro esplora l'ipotesi che l'immunità cellulare promuova la crescita del tumore e possa anche sradicare la malattia. Sebbene contraddittoria, questa teoria si basa sul duplice ruolo del sistema immunitario nel promuovere la protezione dell'ospite contro il cancro e nel facilitare la fuga dal tumore dalla distruzione immunitaria.^{30,31}

L'idea che il sistema immunitario potesse essere in grado di proteggere l'organismo dallo sviluppo di tumori risale agli inizi del Novecento quando, nel 1909, Paul Ehrlich per primo ipotizzò che il sistema immunitario proteggesse l'organismo dallo sviluppo di tumori. Ha affermato che: *"nel corso enormemente complicato dello sviluppo fetale e post-fetale, le cellule aberranti diventano insolitamente comuni. Fortunatamente, nella maggior parte delle persone, rimangono completamente latenti grazie ai meccanismi positivi dell'organismo"*. Questa ipotesi non è stata provata sperimentalmente all'epoca a causa dell'inadeguatezza degli strumenti e delle conoscenze sperimentali.⁴⁶ Quasi 50 anni dopo, Burnet e Thomas proposero la teoria dell'*immune surveillance*, secondo la quale le cellule del sistema immunitario fungono da sentinella nel riconoscere ed eliminare le cellule tumorali nascenti.³²

Da allora gli studi condotti nel corso degli anni hanno dimostrato che l'interazione tra il sistema immunitario ed il tumore è molto più complessa riconoscendo che il sistema immunitario esercita sia un'azione antitumorale che un'azione di "rimodellamento" del tumore verso una minore immunogenicità, il termine "immunosorveglianza dei tumori" non è più stato ritenuto adeguato a descrivere tale processo. Pertanto, dalla teoria

dell'immunosorveglianza si è quindi passati alla teoria dell'*immunoediting* proposta da Robert Schreiber nel 2002.^{33,34}

Questo processo dinamico di *cancer immunoediting*, in base al quale il sistema immunitario non solo protegge dallo sviluppo del cancro ma modella anche il carattere dei tumori emergenti, è composto da tre fasi in sequenza: Eliminazione, Equilibrio ed *Escape* (figura 2).

- **Eliminazione**

In questa fase sia il sistema immunitario innato che quello adattativo rilevano e distruggono i tumori in via di sviluppo prima che diventino clinicamente evidenti. Le cellule presentanti l'antigene tumore-specifico innescano lo sviluppo di una risposta dei linfociti T e le citochine come l'IFN- γ promuovono l'infiammazione locale, portando alla distruzione del tumore. Nel caso dell'eliminazione parziale del tumore si viene a creare uno stato temporaneo di equilibrio tra il sistema immunitario e il tumore in via di sviluppo.^{26,32,34,35}

- **Equilibrio**

La pressione esercitata dal sistema immunitario durante questa fase è sufficiente per controllare la progressione del tumore, ma alla fine, se la risposta immunitaria non riesce ancora ad eliminare completamente il tumore, il processo porta alla selezione di varianti di cellule tumorali in grado di resistere, evitare, o sopprimere la risposta immunitaria antitumorale, portando alla fase di *escape*.^{32,34,36}

- **Escape**

Nella fase di fuga le varianti tumorali selezionate durante la fase di equilibrio possono crescere in un ambiente immunologicamente intatto, espandendosi così in modo incontrollato. I meccanismi di fuga delle cellule tumorali possono essere classificati in tre categorie principali:

- (i) ridotto riconoscimento immunitario e stimolazione delle cellule immunitarie attraverso la *downregulation* o la perdita di antigeni tumorali o mancanza di molecole costimolatorie;
- (ii) sovraregolazione dei meccanismi di resistenza contro gli effettori citotossici dell'immunità (es. STAT3) o aumentata espressione dei geni del fattore di sopravvivenza o di crescita (es. Bcl-2, Her2/neu);
- (iii) creazione di un microambiente tumorale immunosoppressivo attraverso produzione di citochine (es. VEGF, TGF- β); induzione e/o reclutamento di Treg

e MDSC; o induzione della resistenza immunitaria adattativa attraverso l'espressione di recettori inibitori, PD-1, CTLA-4, LAG-3 su cellule effettrici immunitarie.^{32,35,36}

Un'evidenza clinica del fatto che esiste, negli esseri umani, il processo di *cancer immunoediting* proviene da un crescente corpo di prove che dimostrano che la presenza dei linfociti infiltranti il tumore (TILs) in pazienti oncologici, è correlata con un miglioramento dell'*outcome* clinico.³⁶

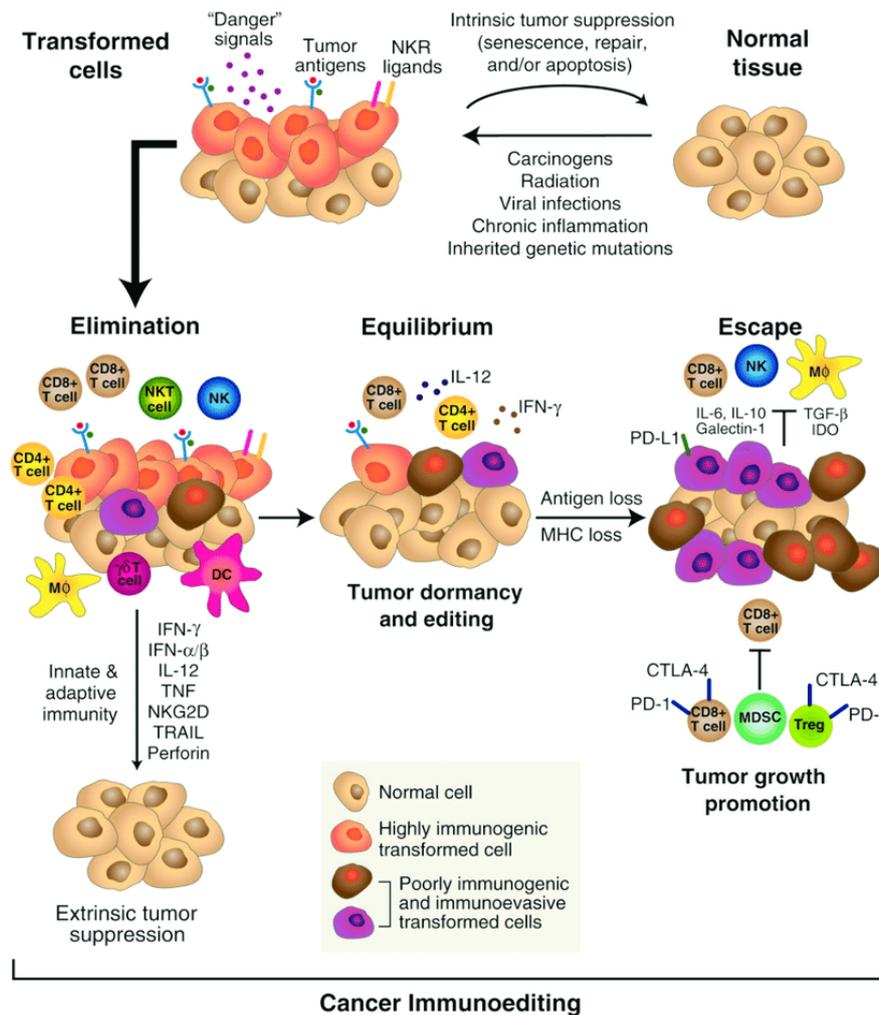


Figura 1. Le tre fasi del Cancer Immunoediting: Eliminazione, Equilibrio, Escape³⁹

2.4 Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs)

La presenza di linfociti infiltranti il tumore (*Tumor-Infiltrating Lymphocytes* - TILs) all'interno del microambiente tumorale è considerata un'indicazione della risposta immunitaria dell'ospite agli antigeni tumorali e si pensa che rifletta il processo dinamico di *immunoediting* del cancro. È prontamente accettato che i linfociti infiltranti il tumore possano attaccare e sradicare le cellule tumorali. Molti studi su un'ampia varietà di tumori umani hanno

mostrato una chiara associazione tra la presenza di linfociti infiltranti il tumore e la sopravvivenza del paziente.^{26,36-41}

Per definizione, i TILs sono leucociti che hanno lasciato il circolo sanguigno e si sono localizzati nello stroma tumorale (TILs stromali) o all'interno delle isole tumorali (TILs intraepiteliali). I TILs sono cellule immunitarie mononucleate presenti in proporzioni variabili, ad esempio linfociti T, linfociti B, linfociti *Natural Killer* (NK), macrofagi, sebbene il citotipo più abbondante sia rappresentato dai linfociti T. Si ritiene che il sistema immunitario, in particolare i TILs intraepiteliali, svolgano un ruolo importante nel controllo della crescita tumorale in quasi tutti i tumori solidi e il carcinoma ovarico non fa eccezione.^{26,42,43}

La densità dei TILs nei tumori è stata recentemente utilizzata per classificare i tumori. I tumori vengono definiti "caldi" o immunogenici se sono costituiti da un numero elevato di TILs, mentre i "tumori freddi" hanno un numero molto inferiore di TILs.⁴⁴ Non solo la quantità di infiltrazione linfocitaria, ma anche il fenotipo di tale infiltrato determina l'*outcome* clinico.

2.4.1 Linfociti T

I linfociti T (detti anche cellule T) sono i responsabili dell'immunità cellulo-mediata (chiamata anche immunità cellulare). Le due sottopopolazioni principali di linfociti T sono i linfociti T *helper* CD4+ e i linfociti T citotossici (CTL) CD8+, e funzionano come mediatori dell'immunità cellulare. I linfociti T regolatori (Treg) CD4+CD25+ rappresentano un terzo tipo di linfociti T e la loro funzione è quella di inibire le risposte immunitarie.⁴⁵

Entrambe le cellule T CD4+ e CD8+ si accumulano nel microambiente tumorale, ma con distinte tendenze dinamiche durante lo sviluppo e la progressione del cancro. Ai linfociti T CD8+ viene attribuito principalmente il ruolo di cellule *killer* citotossiche nel contesto dell'immunobiologia del cancro. L'infiltrazione di tali cellule nel microambiente tumorale è fortemente associata a una buona prognosi e a una sopravvivenza libera da malattia più lunga in diversi tipi di cancro, incluso il carcinoma ovarico. Nel cancro ovarico, i pazienti con densità più elevate di CTL intraepiteliali hanno mostrato una sopravvivenza significativamente migliorata rispetto ai pazienti con densità di CTL inferiori. Tuttavia, il microambiente del cancro ovarico possiede una vasta rete di processi immuno-inibitori per contrastare l'attacco dei linfociti T citotossici, compreso il reclutamento di vari sottogruppi di leucociti con una potente attività immunosoppressiva.^{26,46}

Anche le risposte dei linfociti T CD4⁺ possono essere di fondamentale importanza nel cancro, sia per aiutare a reclutare i linfociti citotossici CD8⁺ nel tumore sia per generare un ambiente infiammatorio locale che supporta la funzione di questi CTL all'interno del tumore. Le sottopopolazioni di cellule T CD4⁺ cambiano dinamicamente, indicando funzioni distinte delle cellule T CD4⁺ nei diversi stadi di sviluppo del tumore. Le cellule CD4⁺ T *helper* 1 (Th1) sono coinvolti nei fenomeni di rigetto tumorale attraverso la produzione delle citochine IL-2 e IFN- γ , i quali portano all'attivazione dei linfociti T citotossici CD8⁺.^{46,47} Un numero elevato di cellule Th1 nel microambiente tumorale è stato associato a una buona prognosi in molti tipi di cancro, tra i quali anche il carcinoma ovarico.⁴⁶

Le cellule T *helper* 2 (Th2) sono legate alla soppressione della risposta immunitaria antitumorale. Le citochine secrete da Th2 come IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 sembravano svolgere un ruolo importante nell'evasione e nella fuga delle cellule tumorali nel processo di immunosorveglianza. Tuttavia, ci sono prove a favore di un ruolo delle cellule Th2 anche nella regressione delle cellule tumorali.⁴⁶

Le cellule Th17 sembrano generare effetti di crescita pro o antitumorale, dunque, il loro ruolo nell'immunobiologia del cancro ovarico non è ancora del tutto chiaro. Le cellule Th17 potrebbero partecipare all'induzione della risposta antitumorale nelle pazienti con cancro ovarico.^{47,48}

I linfociti T regolatori (Treg) sono comunemente caratterizzati dall'espressione di CD4 e CD25 e FoxP3. Le Treg sono responsabili del mantenimento dell'omeostasi immunitaria controllando l'autoimmunità, l'infiammazione, nonché le risposte ai tumori. Le Treg infiltranti il tumore appartengono alla sottopopolazione non linfoide, che differisce dalle Treg presenti nella circolazione o negli organi linfoidi per la produzione delle citochine immunosoppressive IL-10 e TGF- β . Le Treg regolano negativamente le risposte antitumorali sia in modo diretto che indiretto, sopprimendo le funzioni antitumorali mediate dalle cellule T effettrici all'interno del microambiente tumorale, il che sosterebbe la progressione della malattia e si tradurrebbe in uno scarso *outcome* clinico in diversi tumori incluso il carcinoma ovarico. Numerosi studi indicano che una maggiore presenza di Treg inibisce la risposta immunitaria citotossica antineoplastica in quanto sopprimono l'attività effettrice locale dei linfociti CD8⁺. Rappresentano dunque i sottotipi cellulari principalmente responsabili dei fenomeni di tolleranza immunitaria e di "tumor escape". Nel contesto dell'immunità tumorale, un elevato infiltrato linfocitario di Treg è principalmente correlato con una

prognosi sfavorevole, come si osserva nei tumori dell'ovaio, della mammella.^{26,49-51} (figura 3).

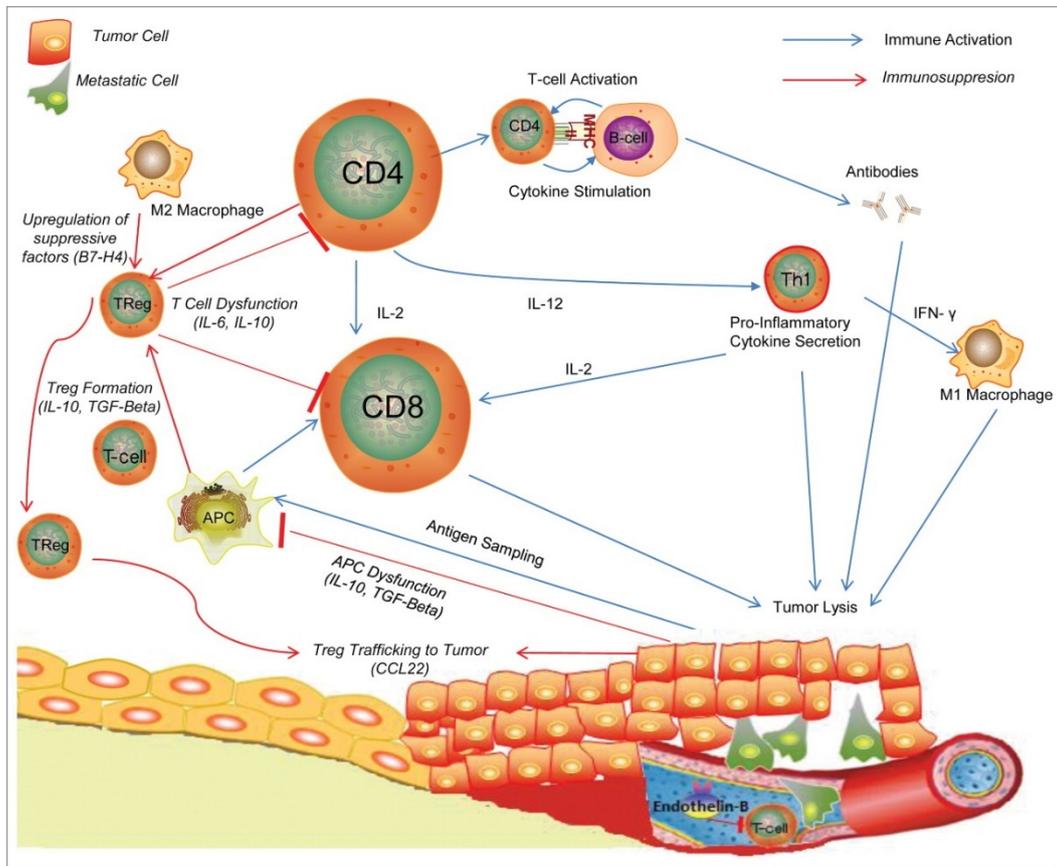


Figura 2. Interazioni delle cellule immunitarie nel microambiente tumorale²⁶

È accertato, quindi, che un'efficace risposta immunitaria antitumorale richiede il coinvolgimento di entrambe le cellule T CD4+ e CD8+. Inoltre, con la progressione del tumore è stata osservata che un aumento significativo della percentuale e del numero di cellule T CD4+ nelle fasi tardive della progressione dei tumori è associato con la promozione della crescita tumorale. Quindi i linfociti T CD4+ intra-tumorali hanno effetti prognostici negativi sugli esiti dei pazienti con tumori ginecologici. Al contrario, i linfociti T CD8+ intratumorali sono la principale popolazione di cellule effettrici e hanno un effetto prognostico favorevole sull'immunità con conseguente miglioramento dei risultati clinici. Dunque, le cellule T CD8+ piuttosto che i linfociti T CD4+ contribuiscono agli effetti antitumorali.⁵¹ È importante considerare anche il rapporto CD4/CD8, in particolare è stato osservato che un basso rapporto CD4/CD8 (o un alto rapporto CD8/CD4) è stato associato a una sopravvivenza significativamente migliorata. Rapporti CD4/CD8 marcatamente

aumentati, invece, sono stati osservati negli stadi tardivi del tumore rispetto agli stadi precoci. Un elevato rapporto CD4/CD8 potrebbe indicare una maggiore presenza di linfociti Treg e viene associato a scarsi *outcomes* clinici.⁵²⁻⁵⁴

Quindi, non solo la presenza di linfociti T che infiltrano il tumore è importante per l'esito clinico, ma anche i diversi sottotipi di cellule T presenti influenzano i risultati.⁵⁵

2.4.2 Linfociti NK

Le cellule *Natural Killer* (NK) sono linfociti del sistema immunitario innato e sono definite dall'espressione dei marcatori di adesione cellulare CD56 e CD16 e dalla mancanza del recettore delle cellule T. Le cellule NK sono effettori cruciali nell'immunosorveglianza del cancro, riconoscendo e uccidendo spontaneamente le cellule maligne. Le cellule NK attivate mediano le risposte antitumorali secernendo citochine e chemochine pro-infiammatorie come IFN- γ , TNF α , IL-6, che influenzano l'attività antitumorale e promuovono risposte innate e adattative nel microambiente tumorale. Le cellule NK possono controllare i tumori direttamente interagendo con le cellule tumorali e indirettamente influenzando le attività di altre cellule immunitarie nel microambiente.^{42,54,56,57}

La capacità delle cellule NK di uccidere le cellule tumorali senza una precedente sensibilizzazione fa sì che queste cellule svolgano un ruolo nell'immunosorveglianza del tumore. I linfociti NK possono eliminare i bersagli che non esprimono un numero sufficientemente elevato di molecole MHC-I. L'espressione di queste molecole viene spesso persa durante la trasformazione neoplastica, consentendo alle cellule di sfuggire all'immunosorveglianza dei linfociti T CD8+, la quale richiede la presentazione degli antigeni da parte delle molecole MHC-I. La *downregulation* di queste molecole rende le cellule invisibili ai linfociti T, ma con la perdita dei principali ligandi per i recettori inibitori delle cellule NK (KIR e CD94/NKG2A), le cellule NK non sono più inibite.⁵⁸

Nonostante ciò, per diversi tumori solidi è stata rivelata una scarsa infiltrazione di cellule NK e sebbene siano presenti nel microambiente tumorale, la funzione di queste cellule nei pazienti oncologici è spesso soppressa. Molte evidenze indicano che le cellule NK, pur rappresentando un sottoinsieme estremamente raro di cellule immunitarie, sono in grado di invadere alcuni tumori solidi e, quando attivate funzionalmente, sono associate a una buona prognosi. Tuttavia, in molti casi, il quadro è molto più complesso, con risultati contraddittori ed effetti nulli o negativi sulla prognosi del paziente. Numerosi studi hanno

riportato che le cellule NK che si infiltrano nel sito tumorale hanno un fenotipo anergico che è indotto dal TGF- β .

Il TGF- β , citochina prodotta da cellule tumorali, Treg, MDSC e altre cellule stromali, altera la funzione delle cellule NK direttamente o indirettamente dal contatto cellula-cellula tra NK e altre cellule produttrici di citochine. Come effetto diretto, il TGF- β limita la citotossicità delle cellule NK e la produzione di IFN- γ .^{47,57-59}

Un alto livello di cellule NK intratumorali è stato associato a una prognosi migliore in diversi tumori. Nel carcinoma ovarico, il valore prognostico delle cellule NK infiltranti il tumore è stato dibattuto: le cellule NK si infiltrano insieme alle cellule T citotossiche e sono fortemente associate alla sopravvivenza del paziente. Tuttavia, anche quando sono presenti le cellule NK sono disfunzionali: mostrano una ridotta proliferazione, una ridotta funzione citolitica e una ridotta produzione di citochine infiammatorie rispetto alle cellule NK del sangue periferico dello stesso paziente.

Nel loro insieme, la letteratura disponibile indica che le cellule NK interagiscono dinamicamente con i componenti del microambiente tumorale del carcinoma ovarico. Tuttavia, l'infiltrazione di cellule NK in un tumore può predire solo parzialmente gli *outcomes* clinici.⁶⁰

2.4.3 Linfociti B

I linfociti B infiltranti il tumore possono differenziarsi in diversi sottotipi funzionalmente distinti sotto l'influenza di molti fattori nel microambiente tumorale. Questi diversi sottotipi di cellule B contribuiscono a risposte sia pro che anti-immunitarie. L'equilibrio di queste risposte può influenzare lo sviluppo e il comportamento del tumore.^{54,61-63}

I linfociti B infiltranti il tumore agiscono direttamente sulle cellule tumorali, ma regolano anche indirettamente l'immunità tumorale influenzando la funzione di altre cellule immunitarie come i linfociti T CD4+. I linfociti B presentano gli antigeni ai linfociti T helper e ciò costituisce un momento essenziale nella cooperazione tra i linfociti T *helper* e i linfociti B nelle risposte anticorpali.^{45, 61,62,64,65}

Oltre alle funzioni dei linfociti B di inibire lo sviluppo del tumore, prove convincenti suggeriscono che i linfociti B possono promuovere la tumorigenesi e la progressione del tumore contribuendo a un microambiente angiogenico e pro-infiammatorio e sopprimendo direttamente o indirettamente l'attivazione dei linfociti T.^{61,62,64}

Per quanto riguarda il carcinoma ovarico, sono stati trovati linfociti B intraepiteliali e si propone che la loro presenza sia associata a una buona prognosi.^{54,61}

2.4.4 PD-1 e PD-L1

La progressione tumorale è associata con l'aumento di espressione dei marcatori di "esaurimento" delle cellule T, i quali diventano "esausti". Le cellule T esauste sono funzionalmente caratterizzate da una perdita di produzione di IL-2, ridotta capacità proliferativa, ridotta capacità citotossica e ridotta produzione di citochine pro-infiammatorie. Uno dei principali *marker* dell'esaurimento dei linfociti T è una maggiore espressione di molecole dei *checkpoint* immunitari sulle cellule T, come PD-1 (*Programmed Cell Death-1*), è stato dimostrato che la funzione dei linfociti T diminuisce con l'aumentata espressione di queste molecole.^{29,66}

L'esaurimento può essere invertito bloccando i ligandi di segnalazione espressi sulle APC, cellule tumorali o cellule immunitarie infiltranti il tumore. Pertanto, poiché molti dei *checkpoint* immunitari sono avviati dalle interazioni ligando-recettore, l'attenzione terapeutica principale è attualmente posta sullo sviluppo di anticorpi che bloccano queste interazioni potenziando l'immunità tumorale a più livelli. Questi anticorpi sono chiamati inibitori dei *checkpoint* immunitari e hanno dimostrato notevoli benefici negli studi clinici per diversi tumori, incluso il carcinoma ovarico.^{51,67}

La proteina PD-1 è espressa sulle cellule T attivate per attenuarne la funzione effettrice. Il recettore PD-1, normalmente, serve per mantenere l'autotolleranza e modulare la durata e l'ampiezza della risposta immunitaria fisiologica. Inizialmente identificato per la sua capacità di indurre l'apoptosi, funziona come regolatore negativo del sistema immunitario, limitando l'attività delle cellule T effettrici all'interno del tumore.^{35,68} È una molecola comunemente espressa dai TILs influenzandone la loro capacità di distruggere le cellule tumorali. PD-1 è espresso principalmente sui linfociti T CD4+ attivati e sui linfociti T CD8+. PD-1 inibisce l'attività delle cellule T effettrici nelle risposte immunitarie in fase tardiva (fase effettrice) nei tessuti periferici e nel microambiente tumorale dove le cellule T incontrano i ligandi di PD-1. (Figura 4)

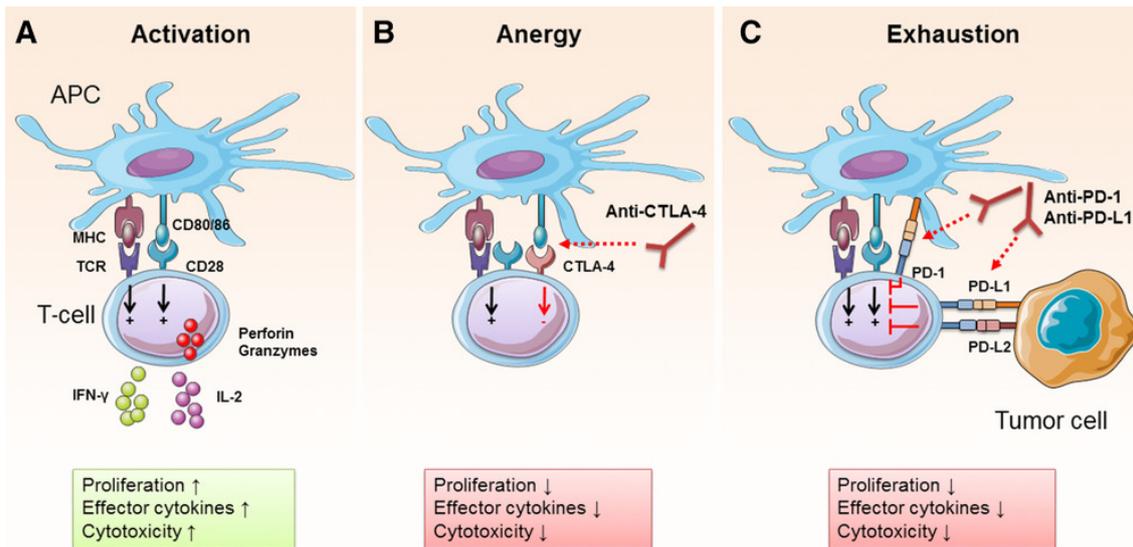


Figura 4. Meccanismi d'azione dei checkpoint immunitari CTLA-4 e PD-1

Questo si traduce in un importante meccanismo di resistenza immunitaria all'interno del microambiente tumorale. L'espressione di PD-1 sui linfociti T regola prevalentemente l'attività delle cellule T effettrici all'interno dei tessuti e dei tumori bloccando l'ingresso nel ciclo cellulare e la produzione di citochine.^{26,66-68}

L'esposizione cronica all'antigene può portare a livelli elevati di espressione persistente di PD1, che induce uno stato di esaurimento o anergia dei linfociti T.

I due ligandi del recettore inibitorio PD1 sono PD-L1 (anche conosciuto come CD274 o B7-H1) e PD-L2 (anche noto come CD273 o B7-DC), identificati come ligandi di PD-1 rispettivamente nel 2000 e nel 2001. Dei due ligandi, PD-L1 sembra essere il più rilevante nel microambiente tumorale ed è espresso su un'ampia gamma di cellule tumorali.^{55, 67-70}

Oltre a inibire le risposte delle cellule T effettrici, l'asse PD-1/PD-L1 sembra essere implicato anche nella promozione dell'induzione delle cellule Treg.^{55,66,68}

È ora chiaro che l'impegno dei recettori dei *checkpoint* immunitari sui linfociti T CD8+ attivati rappresenta un importante meccanismo di immunosoppressione indotta dal tumore.⁵¹ La via di segnalazione PD-1/PD-L1 è cruciale per smorzare l'immunosorveglianza per i tumori, i quali possono sfuggire alla sorveglianza immunitaria dell'ospite esprimendo PD-L1, che regola negativamente le risposte immunitarie interagendo con PD-1 sui linfociti T. Studi hanno indicato che il blocco della segnalazione di PD-1 potrebbe migliorare i risultati clinici per i pazienti con queste neoplasie.^{55,68}

2.4.5 Rapporto neutrofili/linfociti (NLR) come nuovo indice prognostico nei tumori

L'infiammazione gioca un ruolo chiave nella fisiopatologia di molte malattie, incluso il cancro, e l'identificazione di parametri affidabili e facilmente ottenibili per lo stato dell'infiammazione sistemica è diventata una priorità assoluta.⁷¹ Recentemente, un elevato rapporto tra neutrofili e linfociti (NLR) è stato suggerito come un *marker* di risposta infiammatoria sistemica in pazienti critici ed è stato riconosciuto come indicatore prognostico prontamente disponibile e poco costoso che potrebbe essere utilizzato nella pratica clinica oncologica quotidiana in vari tipi di cancro. Tuttavia, la consistenza e l'entità dell'impatto prognostico di NLR non sono ancora chiare.^{72,73} L'NLR è un rapporto determinato dividendo il numero di neutrofili per il numero dei linfociti in un campione di sangue periferico. Un valore dell'NLR al di sopra del *cut-off* è associato a una sopravvivenza avversa in molti tumori solidi. I meccanismi alla base dell'associazione tra NLR elevato e scarso esito dei pazienti oncologici sono ancora poco conosciuti. Sebbene i neutrofili siano parte integrante della risposta immunitaria innata, sono stati documentati sia il ruolo di promozione del tumore che quello immunosoppressivo dei neutrofili. Oltre a sopprimere l'attività citolitica delle cellule immunitarie come linfociti T CD8+ e cellule NK, secernono fattori che promuovono la crescita del tumore, incluso il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), il fattore di crescita degli epatociti (HGF), IL-6, IL-8, e quindi probabilmente contribuiscono a stimolare il microambiente tumorale.⁷¹⁻⁷³ La linfocitopenia relativa, determina un calo significativo della risposta immunitaria adattiva cellulo-mediata. Sia la neutrofilia sistemica che la linfopenia sono associate a una prognosi peggiore nei pazienti oncologici, da ciò si deduce che i pazienti con NLR elevato presentano una prognosi peggiore e un aumentato rischio di recidiva del tumore.^{71,72}

Molte pazienti con cancro ovarico hanno un NLR significativamente elevato, indicando che la misurazione NLR potrebbe diventare parte della diagnosi di *routine* del cancro ovarico in fase iniziale. Inoltre, è stato evidenziato che i pazienti con un NLR elevato alla diagnosi presentano tassi di sopravvivenza globale significativamente peggiori. La misurazione preoperatoria dell'NLR nelle pazienti con carcinoma ovarico potrebbe fornire un metodo semplice per identificare le pazienti con una prognosi peggiore e aiutare a guidare efficacemente il trattamento.⁷²

3 SCOPO DELLO STUDIO

3.1 Scopo dello studio

Da lungo tempo gli studi sull'immunologia dei tumori hanno dimostrato che il sistema immunitario ha la capacità di riconoscere le cellule tumorali ed eliminarle; tuttavia, le cellule neoplastiche sono in grado di sfruttare diversi meccanismi per sfuggire all'attacco del sistema immunitario. Dato che le popolazioni di immunocellule presenti nel circolo periferico e negli infiltrati del tessuto tumorale tra le pazienti con carcinoma ovarico sono associate positivamente o negativamente all'attività antitumorale, si ritiene che la caratterizzazione di tali popolazioni nel cancro ovarico sia promettente. Pertanto, è stato caratterizzato, in citometria a flusso multiparametrica, l'assetto immunologico delle pazienti con carcinoma ovarico avanzato e quello del microambiente tumorale utilizzando l'analisi immunohistochimica. Inoltre, si è deciso di indagare anche lo stato funzionale delle cellule T utilizzando l'espressione di PD-1/PDL1 come uno degli indici di esaurimento linfocitario. Sono stati anche analizzati i valori di alcuni biomarkers composti, NLR e il rapporto tra CD4+/CD8+, con un noto effetto sugli outcomes oncologici nelle pazienti con carcinoma ovarico.

Valori alti o bassi di alcuni TILs risultano essere fattori prognostici positivi o negativi nelle pazienti affette da carcinoma ovarico, dato già noto in letteratura. Lo scopo del nostro lavoro, oltre che eseguire una dettagliata analisi descrittiva quantitativa delle principali sottopopolazioni linfocitarie a livello sistemico e locale nell'intera coorte in esame e poi suddivise in base ai diversi schemi di trattamento, è quello di caratterizzare qualitativamente i cambiamenti indotti da un determinato tipo di trattamento, a livello sistemico e locale nelle popolazioni linfocitarie. Lo scopo è quello di identificare eventuali variazioni dei parametri immunologici, definendo dei biomarkers che associati ad altre variabili possano predire in futuro l'eventuale risposta a determinati tipi di terapia, migliorandone o peggiorandone in questo modo la prognosi.

È importante, dunque, comprendere l'assetto immunologico sistemico e del microambiente tumorale di ogni singola paziente e come questo sia influenzato dal tipo di trattamento, in modo da promuovere lo sviluppo di immunoterapie personalizzate e che risultino essere più efficaci per prevenire lesioni tumorali visibili, progressione della malattia o recidiva.

3.2 Disegno dello studio

Lo studio ha un carattere osservazionale traslazionale e si pone quale endpoint primario di valutare, attraverso un arruolamento prospettico l'assetto immunologico alla diagnosi, sistemico e locale (TILs), in una coorte di pazienti affette da carcinoma ovarico avanzato (stadio FIGO III-IV), sottoposte a PDS o a NACT e successiva chirurgia di intervallo (IDS). Sarà valutato l'assetto immunologico sistemico dell'intera coorte di pazienti e poi separatamente dei due gruppi di trattamento. Le stesse variabili verranno rivalutate a diversi tempi stabiliti.

In accordo con quanto riportato nelle linee guida nazionali ed internazionali, in presenza di pazienti con sospetto di cancro ovarico avanzato, si procederà ad una laparoscopia diagnostica per poter correttamente valutare l'estensione della malattia intraddominale e procedere ad una corretta diagnosi. L'iter terapeutico verrà stabilito sulla base dell'attribuzione di un punteggio di PI e PCI laparoscopico (APPENDICE 1-2), l'età, il performance status (APPENDICE 3), le comorbidità e l'istologia tumorale. Sulla base di questi fattori si deciderà se procedere ad intervento di debulking chirurgico in UPFRONT o a NACT più IDS. Tutte le pazienti che daranno il proprio consenso saranno sottoposte al test di ricerca mutazionale per i geni BRCA 1 e 2 sia somatico che germinale e test HRD. In tutte le pazienti come da protocollo verranno eseguiti dei campionamenti biotipici dei noduli neoplastici peritoneali e degli esami ematici necessari a poter correttamente formulare la diagnosi; nei casi selezionati verranno considerati nello specifico i valori delle sottopopolazioni linfocitarie sia a livello locale che a livello sistemico. Nello specifico verranno presi in considerazione i dati relativi alle sottopopolazioni linfocitarie, ai checkpoint prestabiliti nel classico iter di trattamento del cancro ovarico avanzato (Figura 5). Pertanto, i valori delle varie sottopopolazioni linfocitarie verranno considerate:

TEMPO T0:

- Laparoscopia diagnostica: un campione di sangue in provetta da emocromo e due campioni di tessuto biotipico peritoneale di 1 cm (carcinosi) in soluzione fisiologica e in formalina 10%.

Chirurgia UP FRONT - PDS:

TEMPO T1

- A 30 giorni dalla chirurgia e prima dell'inizio del trattamento chemioterapico: un campione di sangue in provetta da emocromo.

NACT e successiva chirurgia IDS:

TEMPO T1B:

- Seconda Laparoscopia diagnostica (dopo i cicli di chemioterapia neoadiuvante): un campione di sangue in provetta da emocromo e due campioni di tessuto biotico peritoneale di 1 cm (carcinosi) in soluzione fisiologica e in formalina 10%.

TEMPO T1C:

- un campione di sangue in provetta da emocromo dopo 30 giorni dalla chirurgia e prima dell'inizio del trattamento chemioterapico nelle pazienti sottoposte a IDS.

TEMPO T2:

- A 30 giorni dal termine del trattamento chemioterapico adiuvante: un campione di sangue in provetta da emocromo.

In particolare, lo studio prevede la descrizione dell'assetto immunologico di tutte le pazienti arruolate con diagnosi di cancro ovarico avanzato analizzando i seguenti aspetti chiave della risposta immunologica sistemica e locale:

1) Un primo elemento di rilievo nella valutazione della risposta immunitaria è senz'altro rappresentato dall'entità e tipologia di popolazione linfocitaria attivata. In particolare, i livelli plasmatici e tissutali dei linfociti T CD8+ e T CD4+ che agiscono modulando significativamente la risposta immunologica locale e sistemica determinando un complessivo effetto di stimolo allo sviluppo di una risposta immunologica. Verrà valutato anche il rapporto CD4+/CD8+.

2) L'entità dell'infiltrato linfocitario T-CD4 Treg è uno dei principali fattori che identificano il milieu immunologico nelle pazienti affette da carcinoma ovarico. Tale sottopopolazione linfocitaria, identificabile attraverso l'espressione di specifici recettori agisce sopprimendo la risposta immunitaria citotossica e pertanto abolendo l'azione antineoplastica del sistema immunitario. Non stupisce dunque, che anche nel carcinoma ovarico, numerosi studi abbiano correlato un elevato infiltrato linfocitario Treg tumorale e a livello del sangue

periferico ad un dato prognostico sfavorevole in virtù di uno spiccato microambiente immunotolerogenico favorente la proliferazione neoplastica.

3) L'asse PD-1/PD-L1 risulta implicato nell'inibizione delle risposte delle cellule T effettrici e nella promozione dell'induzione delle cellule Treg. L'espressione di elevati livelli di PD-L1 permette di sfuggire ai meccanismi di immuno-sorveglianza dell'ospite, regolando negativamente la risposta immunitaria legandosi ai recettori PD-1 presenti sui linfociti T.

4) Verranno analizzate ulteriori popolazioni cellulari, quali le cellule NK, i linfociti B⁺ e i monociti-macrofagi. Il ruolo di queste cellule nella risposta al tumore ovarico non è ancora del tutto chiaro. I dati in letteratura mostrano pareri discordanti, non chiarendo un parere unico sul reale effetto prognostico di quelle sottopopolazioni cellulari.

5) Il rapporto neutrofili linfociti - NLR, ha un chiaro ruolo nella risposta immunitaria al tumore ovarico. Una prognosi sfavorevole correla con un valore costantemente alto di questo rapporto.

Tutti i noduli di carcinosi prelevati avranno una dimensione convenzionale di 1 cm.

Su tutti i campioni verrà eseguita un'analisi citofluorimetrica per la corretta valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie.

L'analisi citofluorimetrica sul prelievo ematico verrà analizzata entro un massimo di 12 h dal prelievo.

Tutti i campioni tissutali verranno sottoposti ad una analisi immunoistochimica per una corretta valutazione percentuale dei linfociti CD4⁺ CD8⁺ e Treg, recettori PD-1/PD-L1 e macrofagi CD163⁺, utilizzando specifici anticorpi monoclonali.

Gli esami ematici e l'esito istologico di ogni singola paziente arruolata fanno parte del normale iter terapeutico delle pazienti afferenti presso la UOC di Ginecologia Oncologica dell'ARNAS CIVICIO.

In virtù della scarsità dei dati ad oggi disponibili, non è ancora stata eseguita l'analisi dei valori parziali ottenuti al tempo T2. Ad oggi abbiamo a disposizione soltanto i prelievi ematici e bioptici di 12 pazienti e pertanto si è deciso di soprassedere all'analisi statistica.

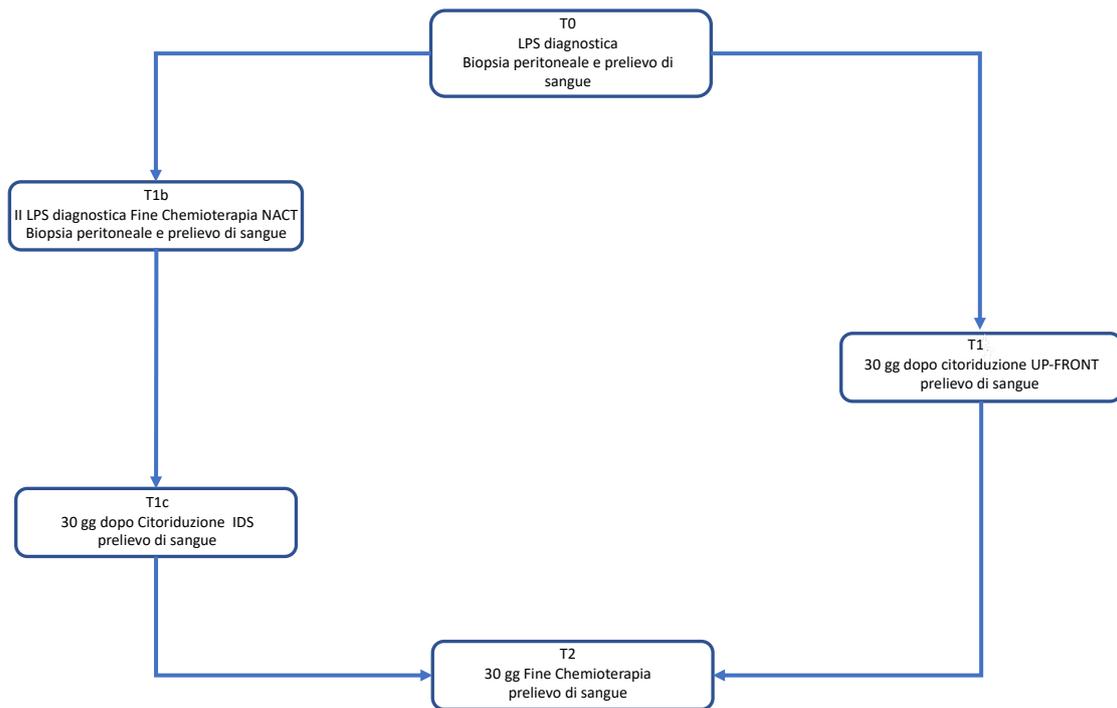


Figura 5: Flow chart dei check point in cui sono stati eseguiti i prelievi bioptici ed ematici

4 Materiali e Metodi

4.1 Citometria a flusso multiparametrica

La citofluorimetria, o citometria a flusso, è una tecnica analitica di laboratorio che consente di rilevare, identificare e contare specifiche cellule sospese in un mezzo fluido (Figura 6).

Questa tecnica permette di valutare la presenza e/o assenza di particolari marcatori, gli antigeni, presenti sulla superficie o all'interno delle cellule stesse. Questo metodo consente di studiare le cellule presenti nel circolo ematico, nel midollo osseo, nei fluidi corporei, o le cellule tumorali. È una tecnica multiparametrica che fornisce dunque per ogni campione, per ogni singola cellula, numerosi dati (vitalità, dimensioni, complessità, fenotipo, ecc).^{74,75}

Il principio del funzionamento del citometro a flusso si basa sulla capacità di raccogliere la fluorescenza emessa dalle cellule in seguito ad opportuna eccitazione luminosa, sia per mezzo di sostanze naturalmente presenti nel campione che per mezzo di molecole fluorescenti (i fluorocromi) artificialmente introdotte.⁷⁶ Quindi, la combinazione di più fluorocromi e di più anticorpi monoclonali permette di analizzare l'espressione di un ampio pannello di antigeni espressi sia su cellule normali che neoplastiche.

L'analisi dei dati così ottenuti consente di avere informazioni sui seguenti parametri:

- numero di cellule appartenenti ad una determinata popolazione rispetto al numero totale di eventi acquisiti;
- percentuale di cellule positive per un antigene di interesse;
- intensità di espressione di un antigene.

I dati così raccolti vengono evidenziati attraverso rappresentazioni grafiche (Figura 7), quali ad esempio gli istogrammi (dove in ascissa viene riportata l'intensità di una fluorescenza e in ordinata il numero di cellule che esprimono o meno l'antigene e quindi la fluorescenza) o i diagrammi a dispersione a punti (*Dot Plot*). Ogni punto del *Dot Plot* rappresenta un singolo evento con un proprio valore per ciascun parametro considerato.

Uno dei principali vantaggi dell'analisi citofluorimetrica è la possibilità di effettuare un "gate", cioè definire una regione specifica per identificare e contare un insieme di cellule con caratteristiche fisiche o immunologiche simili.

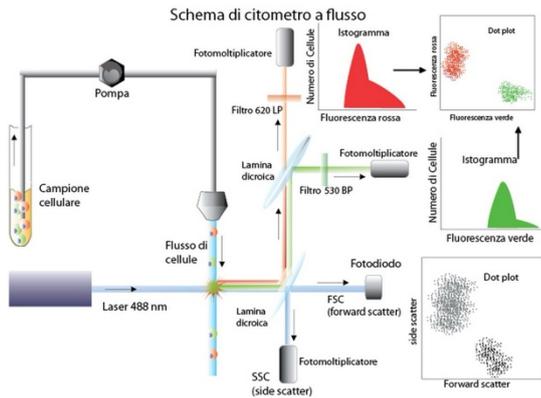


Figura 6. Schema di struttura di un citofluorimetro

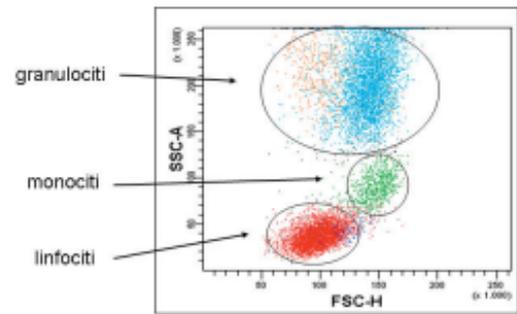


Figura 7. Citogramma (Dot Plot). FS versus SS

4.2 Prelievo di sangue periferico

Il prelievo ematico di sangue periferico arriva in una *Vacvette* con EDTA (provetta tappo viola). Il sangue periferico (700 μ L) viene utilizzato per l'immunofenotipizzazione. La restante parte viene centrifugata a 2000 rpm per 5 minuti. Successivamente, con una Pasteur di plastica monouso si prende il plasma, che servirà successivamente, e si mette in una provetta.

4.2.1 Marcatura con gli anticorpi monoclonali

Per la caratterizzazione fenotipica di superficie, il sangue periferico viene marcato con anticorpi monoclonali. Gli anticorpi monoclonali utilizzati sono elencati nella Tabella 1.

<i>Anticorpo (CD)</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Isotipo</i>	<i>Clone</i>	<i>Quantità utilizzata</i>
CD3	FITC	IgG1 Mouse	UCHT1	10 μ L
	PE			10 μ L
	ECD			10 μ L
	PC5.5			10 μ L
	PB			5 μ L
CD4	FITC	IgG1 Mouse	13B8.2	10 μ L
	PC5.5			10 μ L
	APC		SF12T4D11	5 μ L
	ECD			10 μ L

CD8	FITC ECD PB	IgG1 Mouse	B9.11	10 μ L 10 μ L 5 μ L
CD11c	PE	IgG1 Mouse	BU15	10 μ L
CD14	ECD	IgG2a Mouse	RMO52	10 μ L
CD16	PC7 PB	IgG1 Mouse	3G8	5 μ L 5 μ L
CD19	PC5.5	IgG1 Mouse	J3-119	10 μ L
CD20	FITC PE	IgG2a Mouse	B9E9	10 μ L 10 μ L
CD25	PC7	IgG2a Mouse	B1.49.9	5 μ L
CD27	PB	IgG1 Mouse	1A4CD27	5 μ L
CD38	PC7 APC-A750	IgG1 Mouse	LS198-4-3	5 μ L 5 μ L
CD45	KO APC-A700	IgG1 Mouse	J33	5 μ L 5 μ L
CD45RA	ECD	IgG1 Mouse	2H4LDH11LDB 9 (2H4)	10 μ L
CD56	PE PC7	IgG1 Mouse	N901	10 μ L 5 μ L
CD64	ECD	IgG1 Mouse	22	10 μ L
CD123	PC5.5	IgG1 Mouse	SSDCLY107D2	10 μ L
CD127	FITC	IgG1 Mouse	R34.34	10 μ L
CD183	FITC	IgG1 Mouse	G025H7	10 μ L
CD196	PE	IgG1 Mouse	11A9	10 μ L
CD197	PE	IgG2a Mouse	G043H7	10 μ L

CD274 (PD-L1)	PC7	IgG1 Mouse	PD-L1	5 μ L
CD279 (PD-1)	APC	IgG2b Mouse	PD1.3	5 μ L
HLA-DR	PB	IgG1 Mouse	Immu-357	5 μ L
IgD	FITC	IgG2a Mouse	IA6-2	10 μ L
TCR $\alpha\beta$	PE	IgG1 Mouse	IP26A	10 μ L
TCR $\gamma\delta$	PC5.5	IgG1 Mouse	IMMU510	10 μ L

Tabella 1. Lista degli anticorpi monoclonali utilizzati e dei relativi fluorocromi, cloni di derivazione, isotipi e quantità utilizzata.

La procedura tecnica impiegata prevede la preparazione, di sette tubi (tabella 2)

Tabella 2. Obiettivo analisi di ogni tubo

	Obiettivo analisi
Tubo 1	Chiamato TBNK, permette di vedere le principali popolazioni immunitarie: linfociti T, linfociti B, NK, monociti, neutrofili, linfociti TH e CTL, nonché i linfociti T attivati
Tubo 2	Analisi delle sottopopolazioni dei linfociti TH, Th1, Th2, Th17
Tubo 3	Permette di evidenziare i linfociti T <i>naive</i> , T CM, T EM, T EMRA
Tubo 4	Analisi dei linfociti B (B <i>naive</i> , B <i>IgM memory</i> , B <i>switched</i> , B attivati) e delle plasmacellule
Tubo 5	Analisi delle cellule dendritiche
Tubo 6	Permette di evidenziare i linfociti Treg e le diverse isoforme del TCR
Tubo 7	Analisi d'espressione di PD-1 sui linfociti T

In ogni tubo vengono depositati gli anticorpi monoclonali come indicato nel pannello sottostante (tabella 3).

	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC-700	APC-750	PB	KO
Tubo 1	CD8	CD3	CD14	CD19	CD16+56	CD4		CD38	HLA-DR	CD45
Tubo 2	CD183	CD196	CD3	CD4					CD8	CD45
Tubo 3	CD3	CD197	CD45RA	CD4					CD8	CD45
Tubo 4	IgD	CD20		CD19	CD38				CD27	CD45
Tubo 5	CD3+20	CD11c	CD64	CD123	CD16+56				HLA-DR	CD45
Tubo 6	CD127	TCR $\alpha\beta$	CD4	TCR $\gamma\delta$	CD25				CD3	CD45
Tubo 7	CD4	CD56	CD8	CD3	CD274	CDC279			CD16	CD45

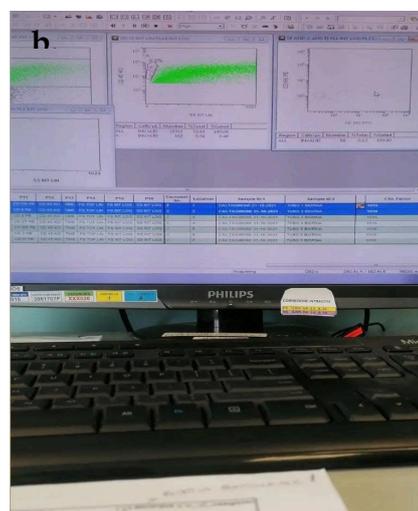
Tabella 3. Pannello guida per la deposizione degli anticorpi monoclonali dei diversi tubi

4.2.2 Acquisizione e strategia di gating

L'acquisizione dei campioni è stata condotta su citofluorimetro Navios EX (Beckman Coulter).



Figura 8. a) Citofluorimetro Navios EX, Beckman Coulter;



b) acquisizione al citofluorimetro

Il software di analisi dei dati utilizzato è il *Kaluza Analysis* (Beckman Coulter) (Figura 8a e 8 b). L'identificazione delle cellule immunitarie è stata eseguita a partire dall'analisi degli antigeni di superficie, realizzando *dot plot* che hanno permesso di definire le popolazioni cellulari basandosi sulle proprietà morfologiche, in modo da discriminare gli eventi indesiderati e creare un riferimento per le successive indagini sui *marker* specifici. La stessa analisi viene effettuata sia per la l'immunofenotipizzazione a partire dal sangue periferico, che per la caratterizzazione dell'infiltrato linfoide presente all'interno delle biopsie tumorali.

Il tubo 1, definito anche TB-NK, permette dapprima di individuare la popolazione cellulare CD45+CD14+, ovvero i monociti. A partire dalle cellule CD45+ ed escludendo la popolazione monocitaria, si vanno a definire i *gate* attorno ai linfociti e ai granulociti (figura

9). In base alla differente intensità di espressione dei *markers* CD16 e CD56, i granulociti vengono analizzati per discriminare i neutrofili maturi (in arancione) dagli eosinofili (in viola) (figura 10).

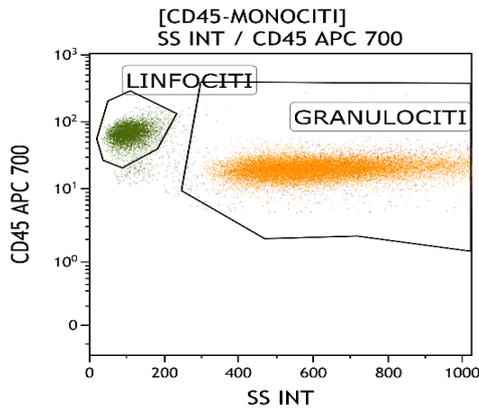


Figura 9. Gate dei linfociti e dei granulociti

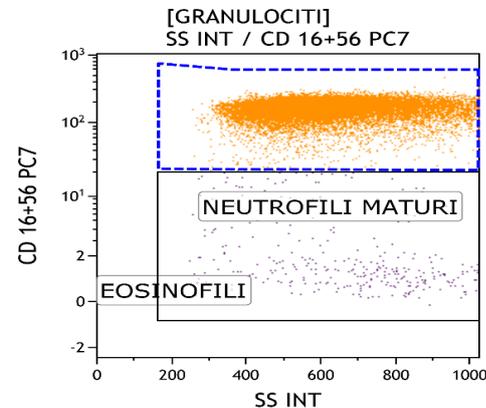


Figura 10. Dot plot CD16+CD56 vs SS per distinguere i neutrofili maturi dagli eosinofili

La popolazione linfocitaria viene poi ulteriormente analizzata per andare ad individuare le diverse sottopopolazioni di linfociti attraverso la diversa espressione dei *markers* specifici. In particolare, si vanno a distinguere i linfociti T, CD3+, e i linfociti B, CD19+ (figura 11). Sempre a partire dal *gate* dei linfociti, è possibile discriminare, con il *dot plot* CD3 vs CD16+CD56, i linfociti T (CD3+) dai linfociti *Natural Killer* (NK) che risultano essere positivi

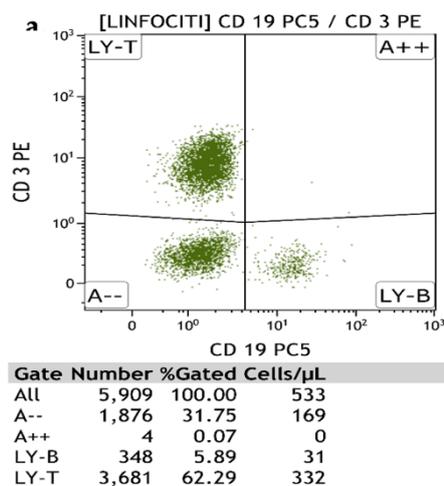


Figura 11. Dot plot CD3 vs CD19: sangue periferico;

per i marker CD56+ e CD16+. Inoltre, è possibile evidenziare i linfociti NK-T (CD3+CD16+CD56+) (figura 12).

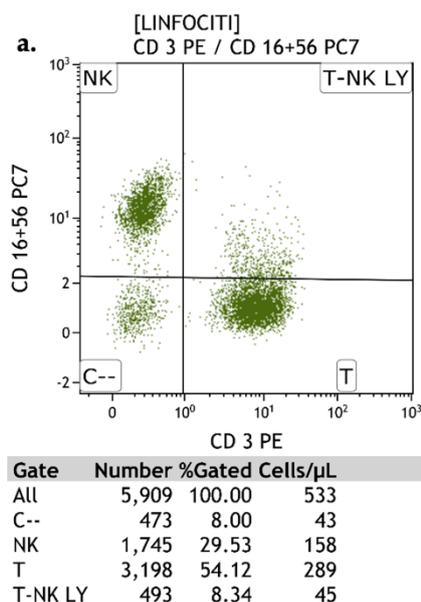


Figura 12. Dot plot CD3 vs CD16+CD56: sangue periferico

Per identificare le due sottopopolazioni di linfociti T CD3+, si parte dal *gate* dei linfociti T e si costruisce un grafico CD4 vs CD8. Basandosi sulla diversa espressione del CD4 e del CD8 si distinguono i linfociti T *helper* (CD4+) e i linfociti T citotossici (CD8+) (figura 13).

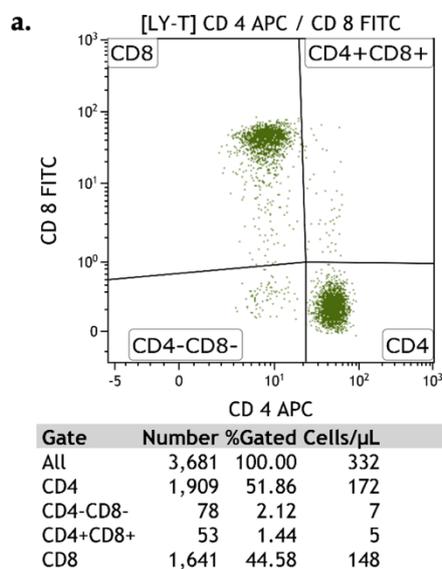


Figura 13. Dot plot CD4 vs CD8: sangue periferico;

Dall'analisi dei dati relativi al tubo 2 si è in grado di distinguere le diverse sottopopolazioni dei linfociti T *helper*, ovvero i linfociti Th1, Th2 e Th17.

L'analisi dei dati relativi al tubo 3 permette di evidenziare, in base all'espressione del CD197 e del CD45RA, i linfociti T *naive* (CD45RA+CD197+), i linfociti T_{CM} (CD45RA-CD197+), i linfociti T_{EM} (CD45RA-CD197-) e i linfociti T_{EMRA} (CD45RA+CD197-), questi non sono stati oggetto della nostra analisi.

Dall'analisi del tubo 4 è possibile identificare i linfociti B *naive* (CD27-IgD+), i linfociti B di memoria (CD27+IgD+), i linfociti B *switched* (CD27+IgD-), i linfociti B attivati (CD20+CD38+) e le plasmacellule (CD20-CD38+), di quest'ultime è possibile vedere quante sono quelle che secernono anticorpi (CD27+CD38+).

Con l'analisi del tubo 5 si evidenziano le cellule dendritiche (DC). Le cellule dendritiche sono caratterizzate dalla mancanza di marcatori specifici di appartenenza come CD3, CD19, CD16, CD14 che le distinguono dai linfociti T e B, cellule NK e monociti. A questo punto si passa all'analisi del tubo 6 che permette di identificare i linfociti Treg. Dapprima si prendono i linfociti T CD4+, dopodiché si costruisce un *dot plot* CD25 vs CD127. I linfociti Treg si caratterizzano per l'espressione del CD4, del CD25 e per una bassa espressione del CD127 (CD4+CD25+CD127_{low}) (figura 14).

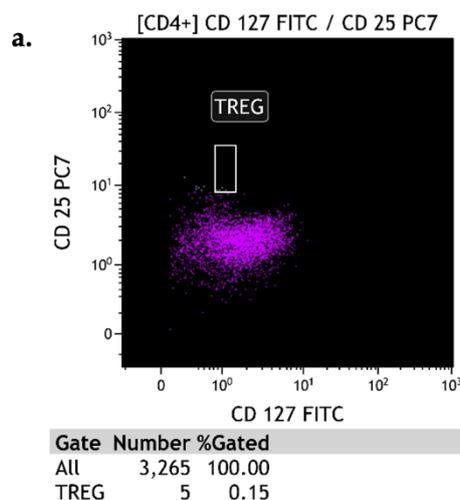


Figura 14. Dot plot CD25 vs CD127. sangue periferico

L'ultimo tubo, il tubo 7, permette di valutare, attraverso l'espressione di PD-1(CD279), l'esaurimento funzionale dei linfociti T. Inoltre, viene indagata anche l'espressione del recettore di PD-1, PD-L1 (CD274). Dapprima si evidenziano i linfociti T attraverso l'espressione del CD3+; in seguito costruendo un grafico CD3 vs CD279 si vanno a prendere le cellule CD3+ che sono positive anche per PD-1+ (figura 15a), poi si va a vedere, in base ai parametri FS vs SS, se PD-1 clusterizza (figura 15b).

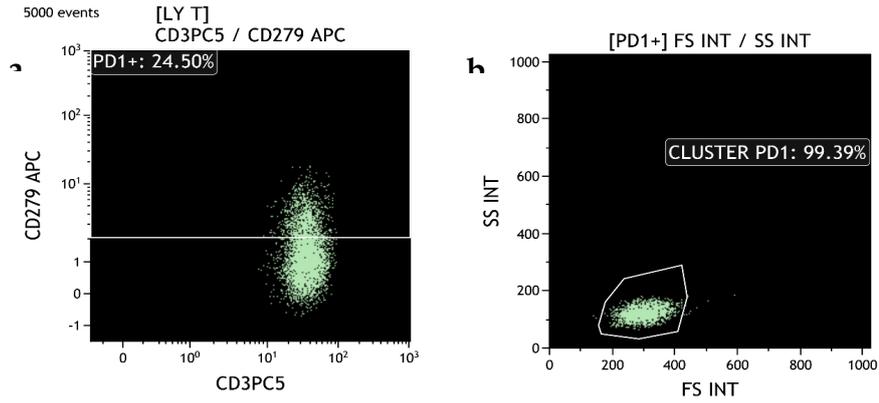


Figura 15. a) Dot plot CD3 vs CD279; b) cluster di PD-1

Mentre il dot plot CD3 vs CD274 ci permette di vedere se vi è espressione di PD-L1 (figura 30).

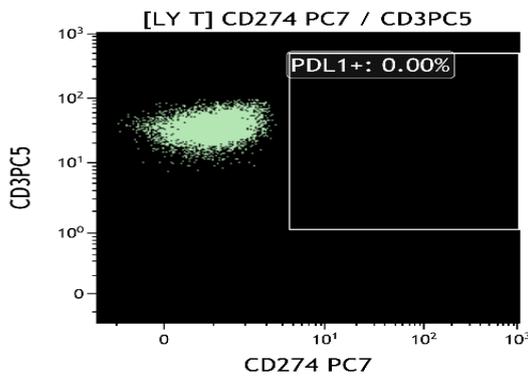


Figura 16. Dot plot CD274 vs CD3 per valutare espressione di PD-L1

Infine, si va a vedere l'espressione di PD1 sui linfociti T helper (figura 17a) e sui linfociti T citotossici (figura 17b).

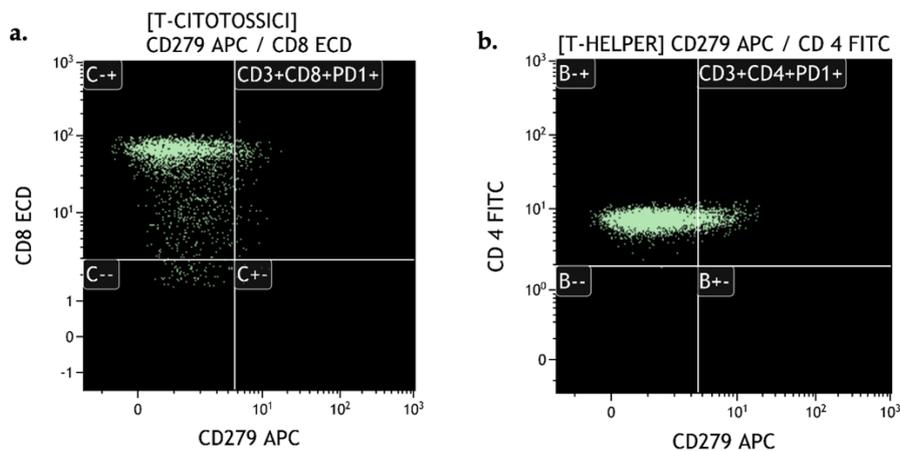


Figura 17. a) espressione di PD1 sui CTL nel sangue; b) espressione di PD1 sui TH nel sangue;

Infine, per ogni paziente vengono compilati due referti, come quello in figura 18, in cui vengono riportati i risultati relativi all'analisi del sangue periferico e della biopsia tumorale.



Paziente:
P.O. Civico
Data:

Reperto: Ginecologia Oncologica
Diagnosi: CA ovarico
Referto data:

Tipo prelievo: periferico/biopsia

POPOLAZIONI	GATE	%	X10 ⁹ /μL	V.R.%	V.R. μL
WBC CD45+	CD45/SS	100	24.4		7.0 (3.6-10.2)
LINFOCITI	CD45/SS	5.32	1.30		2.3 (1.2-4.1)
MONOCITI	CD45/SS	4.47	1.09		0.5 (0.21-1.0)
MONOCITI INFIAMMATORI	MONOCITI	17.6	0.19		
NEUTROFILI	CD45/SS	89.7	21.9		4.5 (1.3-7.4)
EOSINOFILI		30.0	0.07		
CD3+ T	LINFOCITI	66.0	0.86	67 (50-91)	1.5 (0.78-3.0)
CD3+DR+	LINFOCITI T	3.00	0.02		
CD3+CD38+	LINFOCITI T	1.72	0.01		
CD3+CD4+ TH	LINFOCITI	30.0	0.39	42 (28-64)	1.0 (0.5-2.0)
CD3+CD8+ TC	LINFOCITI	24.6	0.32	22 (12-40)	0.5 (0.2-1.2)
CD3+CD4+cd8+	LINFOCITI	8.46	0.11		
CD3-CD16+56+ NK	LINFOCITI	8.96	0.11	15 (5-49)	0.34 (0.1-1.2)
TNK	LINFOCITI	16.0	0.21		
CD19+CD20+ B	LINFOCITI	24.9	0.32	10 (4-28)	0.23 (0.06-0.8)
Th17	Linfociti T CD4+	16.2		22.0 (10.8-39.0)	
Th1	Linfociti T CD4+	28.5		6.7 (0.6-19.0)	
Th2	Linfociti T CD4+	36.1		68.0±5.0	
CM TH	Linfociti T CD4+	17.0		18.1 (8.3-27.1)	
TH naive	Linfociti T CD4+	34.2		43.1 (17.8-66.3)	
TH memory	Linfociti T CD4+	43.7		32.5 (17.2-51.4)	
TH EMRA	Linfociti T CD4+	5.0		16.7 (7.4-31.9)	
Treg	Linfociti T CD4+	0.02			
Naive B	Linfociti B	83.0		65.0 (44-84)	
Memory B IgM	Linfociti B	3.20		20.4 (9.1-33.1)	
B Switched	Linfociti B	9.00		0.5 (0.1-1.5)	
B attivati	Linfociti B	0.34			
Plasmacellule	Linfociti B	1.15		0.9 (0.1-4.8)	
Plasmacellule secernenti anticorpi	Linfociti B	1.00			
Dendritiche	LIN-DR+	0.04			
Mieloidi	Dendritiche	12.6			
Plasmacitoidi	Dendritiche	1.80			
PD1	LINFOCITI T	35.4			
PDL1	LINFOCITI T	0.03			
PD1	Linfociti T CD4+	36.8			
PD1	Linfociti T CD8+	32.7			

NEUTRO/LINFO=16.86 (v.r.<1.95)
CD4/CD8= 1.21 (v.r.=1-2.5)

Figura 18. Referto che viene stilato per ogni paziente in seguito all'analisi

4.3 Colorazione immunoistochimica e analisi quantitativa

I campioni di tessuto sono stati fissati in formalina tamponata al 10% v/v per 24 ore, lavati con acqua conservati in etanolo al 70% e infine processati e inclusi in paraffina. Le colorazioni immunoistochimiche sono state eseguite su sezioni di tessuto di quattro micrometri di spessore utilizzando il sistema di colorazione IHC e ISH completamente automatizzato BOND-III (Leica).

Secondo il protocollo del produttore, le sezioni sono state smascherate con Epitope Retrieval Solution pH6 o pH9 (RE7113-CE o RE7119-CE, Leica).

Abbiamo utilizzato i seguenti anticorpi primari: anticorpi di topo anti CD8 umano (clone 4B11, Leica), CD4 (clone 4B12, Leica), Foxp3 (clone 236A/E7, Leica) e CD163 (clone 10D6, Leica), anticorpi di coniglio anti PD-1 umano (clone CAL20, Leica) e PD-L1 (clone 7310, Leica). Dopo l'incubazione dell'anticorpo primario, il legame è stato rivelato con il kit di rivelazione BOND Polymer Refine (DS9800, Leica) che contiene blocco di perossidasi, reagente post-primario, reagente Polymer, cromogeno DAB ed ematossilina.

Alla fine di ogni corsa, i campioni controcolorati con ematossilina sono stati coperti con un vetrino coprioggetto utilizzando il mezzo di montaggio Surgipath Micromount (3801731, Leica).

Tutte le sezioni sono state analizzate al microscopio ottico Zeiss Axio Scope A1 (Zeiss, Germania) e le microfotografie sono state raccolte con un ingrandimento di 20x utilizzando una fotocamera digitale AxioCam 503 Color con il software di imaging ZEN2 (Zeiss Germania). L'analisi quantitativa è stata eseguita su cinque aree non sovrapposte utilizzando il software HALO Image Analysis (v3.2.1851.229, Indica Labs) ed è stata calcolata la percentuale media per ciascun marcatore.

4.4 Popolazione in studio

Lo studio è stato condotto presso la U.O.C. di Ginecologia Oncologica, dell'Azienda Ospedaliera ARNAS Civico Di Cristina - Benfratelli di Palermo, nel periodo compreso tra giugno 2021 e luglio 2023 in collaborazione con il Laboratorio Specialistico di Oncologia, Ematologia e Colture cellulari per uso clinico dell'Azienda Ospedaliera ARNAS Civico Di Cristina - Benfratelli di Palermo e con la U.O.C. di Anatomia Patologica del Policlinico di "Palermo Paolo Giaccone".

Il protocollo dello studio è stato sottomesso ed approvato dal Comitato Etico Palermo 2 AOR VILLA SOFIA CERVELLO - ARNAS CIVICO - ASP TP - ASP AG c/o Azienda

Ospedaliera Ospedali Riuniti Villa Sofia Cervello Viale Strasburgo, 233 - 90146 Palermo
"Verbale n 29 prot. amm.vo n 15".

Criteri di inclusione:

- Et  \geq 18 anni
- Diagnosi istologica di: carcinoma ovarico avanzato di origine epiteliale
- STADIO FIGO: \geq III B
- Performance status (ECOG) 0-2
- Consenso informato sottoscritto
- Eleggibilit  ad un trattamento con chirurgia e chemioterapia adiuvante o chemioterapia neo-adiuvante seguita da chirurgia +/- chemioterapia adiuvante

Criteri di esclusione:

- Altra diagnosi
- Concomitanti neoplasie
- Controindicazione alla chirurgia e / o chemioterapia
- Donna incinta o in allattamento
- Paziente sotto tutela
- Recidive di malattia ovarica
- Pazienti precedentemente in cura presso altra struttura

4.5 Analisi statistica

L'analisi statistica   stata effettuata con SPSS Statistics v.26. Per l'analisi statistica descrittiva sono state usate la media, il numero di pazienti e le percentuali. Per comparare i due gruppi IDS e PDS sono stati utilizzati il test di Mann-Whitney e il test esatto di Fisher. Per comparare le variazioni nel tempo di linfociti CD3+,CD4+,CD8+,PD-L1,PD-1, linfociti CD4 + Treg e monociti CD163+ nei gruppi PDS e IDS sono stati utilizzati i test di Wilcoxon (due variazioni nel tempo) e di Friedman(tre variazioni nel tempo). Le curve di Kaplan-Meier sono state utilizzate per stimare la percentuale di DFS e OS , mentre il log-rank test   stato usato per comparare i gruppi .

I fattori predittivi di DFS e OS sono stati valutati usando l'analisi univariata. Un P-value inferiore a 0,05   stato considerato statisticamente significativo.

5 RISULTATI

5.1 Coorte

Questo studio ha incluso una coorte di 95 pazienti che hanno avuto accesso presso l'U.O.C. di Ginecologia Oncologica, con sospetta carcinosi a primitività ovarica. Di queste, 28 pazienti sono state escluse poiché affette da altra diagnosi o per non aver voluto aderire allo studio o per impossibilità ad eseguire la procedura diagnostica. Pertanto, è stata considerata valida per l'analisi una coorte di 67 pazienti con diagnosi di carcinoma di origine ovarica di alto grado (tabella 3). Il risultato istologico ha confermato la diagnosi di carcinoma ovarico sieroso di alto grado in 61 pazienti e di carcinoma ovarico endometrioidale di alto grado in 6 pazienti, sono stati esclusi dall'arruolamento tutti gli altri sottotipi istologici; per le restanti pazienti escluse per altra diagnosi, l'istologico ha evidenziato un tumore secondario, ovvero tumore extraovarico (carcinoma gastro-intestinale); Linfoma; mesotelioma; carcinoma dell'endometrio che ha metastatizzato all'ovaio. In seguito alla laparoscopia diagnostica, 35 pazienti sono state avviate ad una chirurgia citoreducente primaria (gruppo PDS) e 32 sono state avviate ad un percorso di chemioterapia neoadiuvante e a successiva chirurgia di intervallo (gruppo IDS). L'età media alla diagnosi è di 62,5 anni (37-87 anni), le pazienti sottoposte a IDS hanno un'età media di 65 anni (42-87 anni) rispetto alle PDS, che hanno un'età media di 60 anni (37-77 anni), ma questa differenza non è statisticamente significativa. Non ci sono differenze statisticamente significative tra i due gruppi in termini di stadio di malattia alla diagnosi, di valori di emoglobina, di albumina e di CA 125. L'unica differenza statisticamente significativa tra i due gruppi si riscontra in termini dello score PI laparoscopico (il valore PCI non viene riportato in tabella). Le pazienti sottoposte a PDS hanno un PI inferiore rispetto alle pazienti sottoposte a NACT (pv. < 0,01).

Tabella 1. Caratteristiche delle pazienti

	PDS	IDS	Totale	Pvalue
<u>N.Pazienti</u>	35	32	67	
Età media	60 (37-77)	65 (42 - 87)	62,5 (37 - 87)	0,07
Stadio				
III	26(74%)	22(69%)	48(72%)	0,5
IV	9(26%)	10(31%)	19(28%)	
<u>Istotipo</u>				
Carcinoma <u>endometrioide</u> di alto grado	5(15%)	1(3%)	6(9%)	0,4
Carcinoma ovarico sieroso di alto grado	30(85%)	31(97%)	61(91%)	
Performance Status	1(0-1)	1(0-1)	1(0-1)	0,1
Emoglobina	11.6(8.4-14.1)	11.9(7.7-14.3)	11.75(7.7-14.3)	0,2
Albumina	3.29(1.6-4.9)	3.3(1.6 - 4.4)	3,29(1.6-4.9)	0,6
Stato mutazionale				
WT	11(31%)	15(46%)	21(31%)	0,2
BRCA 1	5(14%)	2(6%)	7(10%)	
BRCA 2	2(6%)	2(6%)	4(6%)	
HRD	6(17%)	4(13%)	8(12%)	
BRCA1, HRD	1(3%)	0(0%)	1(1%)	
non eseguito	10(29%)	9(28%)	19(28%)	
CA125	1150 (13-7766)	1519(70-6974)	1334(13-7766)	0,5
PI Laparoscopico	6(4-10)	8(6-12)	6(4-12)	<0,01

5.2 Caratterizzazione linfocitaria del sangue periferico (PB)

L'analisi citofluorimetrica multiparametrica sulle cellule immunitarie circolanti nel sangue periferico è stata ottenuta prendendo in considerazione il valore assoluto ($\times 10^3 / \square L$) relativo alle diverse popolazioni leucocitarie, il quale è stato confrontato con i valori di riferimento. Nel 69% dei 67 campioni analizzati, come mostrato nel grafico in figura 19, i valori dei linfociti T CD3+ ottenuti risultano essere alterati, rispetto ai valori di riferimento (v.r. 0,78-3,00 $\times 10^3 / \square L$).

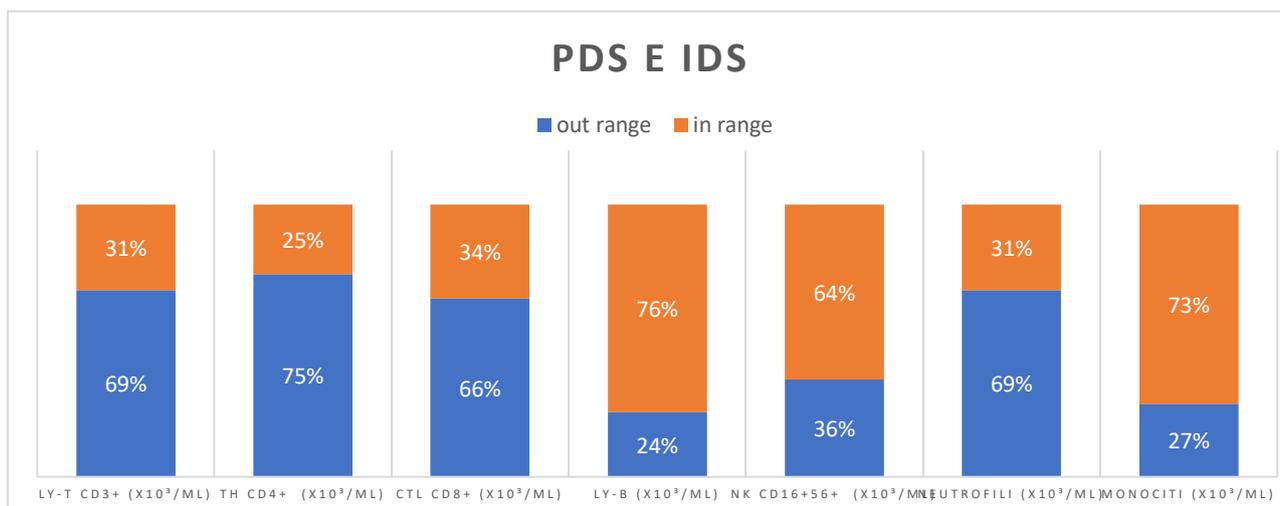


Figura 19. Confronto tra le percentuali dei campioni che rientrano o che non rientrano nei valori di riferimento per le diverse popolazioni leucocitarie nell'intera coorte di pazienti

Anche i dati relativi alle due sottopopolazioni di linfociti T, i linfociti T CD4+ e i linfociti T CD8+, ricadono al di fuori del *range* di riferimento rispettivamente nel 75% e nel 66% dei casi. Il 69% dei campioni analizzati presenta valori out of range di neutrofili rispetto ai valori di riferimento che risultano essere compresi tra $1,3$ e $7,4 \times 10^3/\square\text{L}$.

I valori relativi alle altre popolazioni leucocitarie, linfociti B, cellule NK e monociti, risultano essere alterati in meno del 40% della popolazione.

Successivamente sono state analizzate separatamente le percentuali delle diverse popolazioni linfocitarie nei due diversi gruppi, PDS e IDS ai diversi check-point stabiliti in fase di disegno dello studio.

Gruppo di pazienti PDS (n=35)

Nel gruppo PDS al tempo T0 (Figura 20), i valori dei linfociti T CD3+ risultano essere alterati, rispetto ai valori di riferimento (v.r. $0,78-3,00 \times 10^3/\square\text{L}$) nel 68% dei 35 campioni analizzati. I linfociti T CD4+ e i linfociti T CD8+, ricadono al di fuori del range di riferimento rispettivamente nel 79% e nel 76%. Mentre i neutrofili sono alterati nel 76%. I linfociti B, cellule NK e monociti rispettivamente nel 21%, 32% e 32%. Alla analisi dei 35 campioni a circa 30 giorni dalla chirurgia i valori appaiono nella maggior parte dei casi rientrare nel range dei valori di normalità (Figura 21). Risultano alterati rispettivamente solo il 14% dei linfociti T CD3+, il 24% e il 14% dei linfociti CD4+ e CD8+. Mentre i valori dei neutrofili risultano ancora nel 59% dei casi *out of range*. I valori dei linfociti B e dei monociti risultano alterati solo nel 7% e 32%. Le cellule NK rientrano tutti nei valori di normalità.

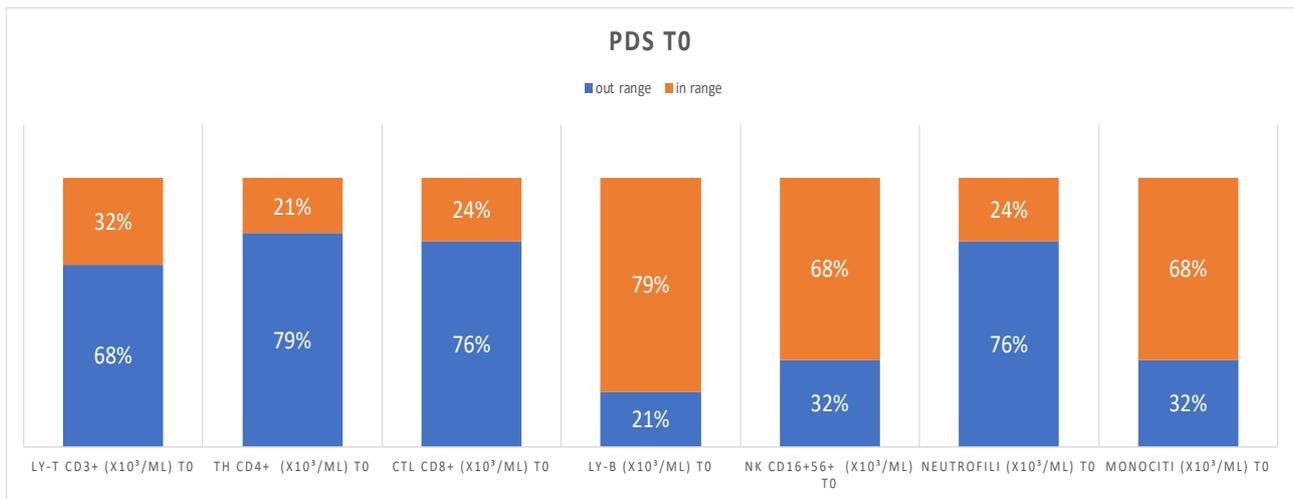


Figura 20. Confronto tra le percentuali dei campioni che rientrano o che non rientrano nei valori di riferimento per le diverse popolazioni leucocitarie nel gruppo PDS al tempo T0

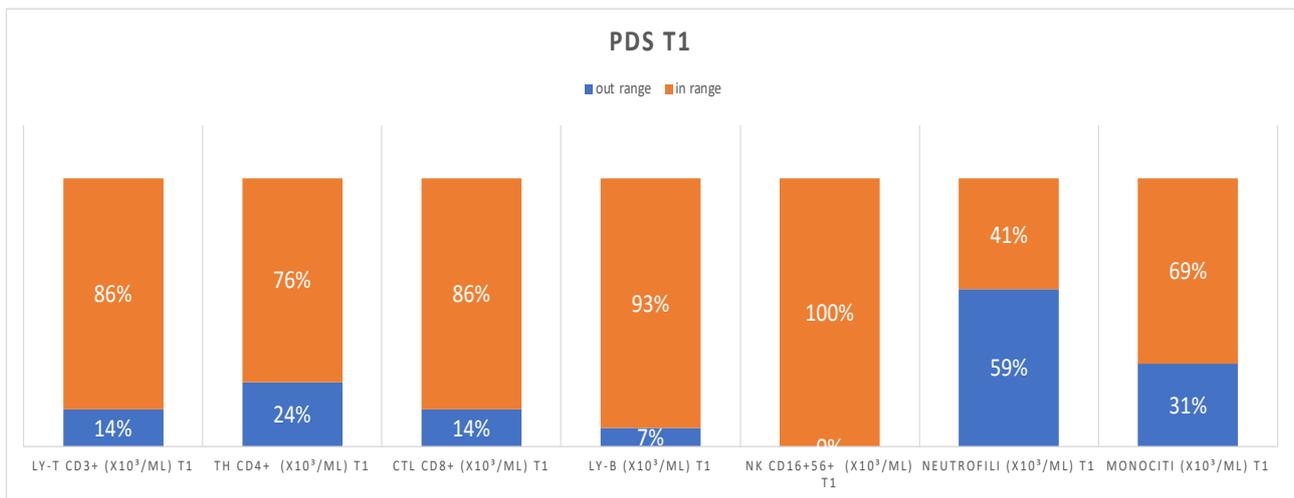


Figura 21. Confronto tra le percentuali dei campioni che rientrano o che non rientrano nei valori di riferimento per le diverse popolazioni leucocitarie nel gruppo PDS al tempo T1

Confrontando i valori ottenuti ai due tempi T0 e T1, si riscontra una differenza statisticamente significativa nella variazione dei linfociti T CD3+, CD4+, CD8+, cellule NK e monociti (p-value: < 0,01). La variazione dei linfociti B+ (p-value: 0,063) e per i neutrofili (p-value: 0,071) non appare statisticamente significativa.

Gruppo di pazienti IDS (n=32)

Nel gruppo delle IDS al tempo T0 (Figura 22), i valori dei linfociti T CD3+ risultano essere alterati, rispetto ai valori di riferimento nel 72% dei 32 campioni analizzati. I linfociti T CD4+ e i linfociti T CD8+, ricadono al di fuori del range di riferimento rispettivamente nel 69% e

nel 56%. Mentre i neutrofili sono alterati nel 63%. I linfociti B, cellule NK e monociti rispettivamente nel 28%,41% e 22%.

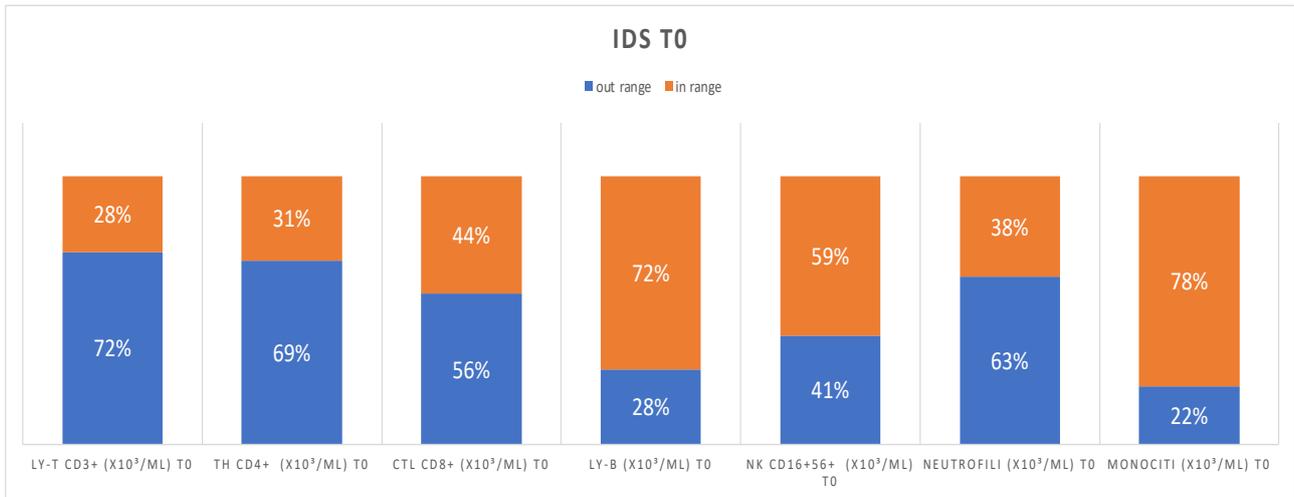


Figura 22. Confronto tra le percentuali dei campioni che rientrano o che non rientrano nei valori di riferimento per le diverse popolazioni leucocitarie nel gruppo IDS al tempo T0

Alla analisi dei 32 campioni sia dopo chemioterapia neoadiuvante (tempo T1B - Figura 23) che a circa 30 giorni dalla chirurgia (tempo T1C - Figura 24) i valori appaiono nella maggior parte dei casi rientrare nel range dei valori di normalità. La percentuale dei linfociti T CD3+ che risultano out of range dopo chemioterapia e poi dopo chirurgia è del 50% e 29%, nel caso dei linfociti CD4+ e del 35% e 21% dopo chemioterapia e chirurgia rispettivamente, mentre nel caso dei CD8+ dopo chemioterapia è del 35% e dopo chirurgia è del 14%. I valori dei neutrofili risultano alterati nel 60% e 50% rispettivamente al tempo T1B e T1C. I valori dei linfociti B ai due check point risultano del 5% e del 14%. Mentre i monociti e le cellule NK mostrano valori percentuali out of range, nei due tempi T1B e T1C, rispettivamente nel 35% e 36% e nel 60% e 21%.

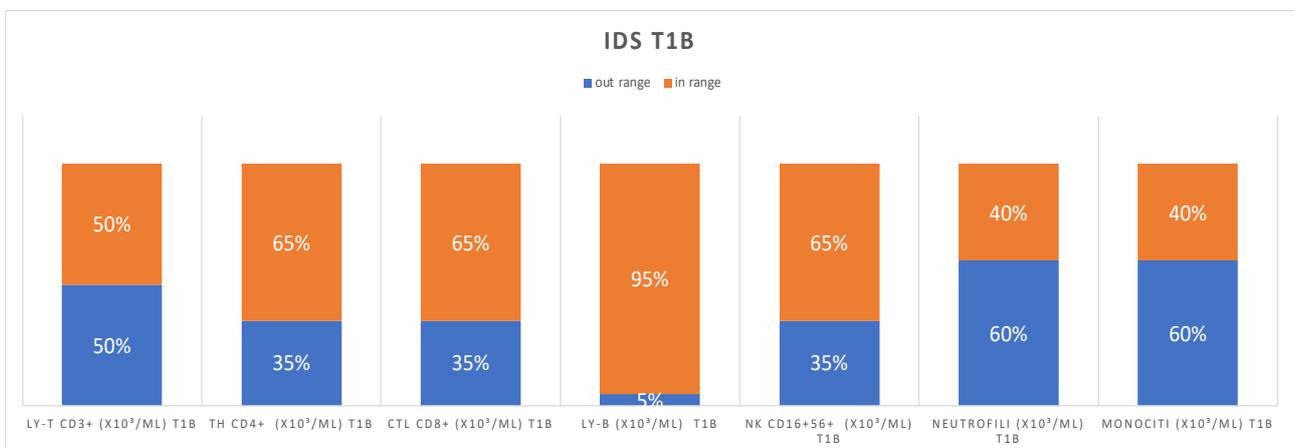


Figura 23. Confronto tra le percentuali dei campioni che rientrano o che non rientrano nei valori di riferimento per le diverse popolazioni leucocitarie nel gruppo IDS al tempo T1B

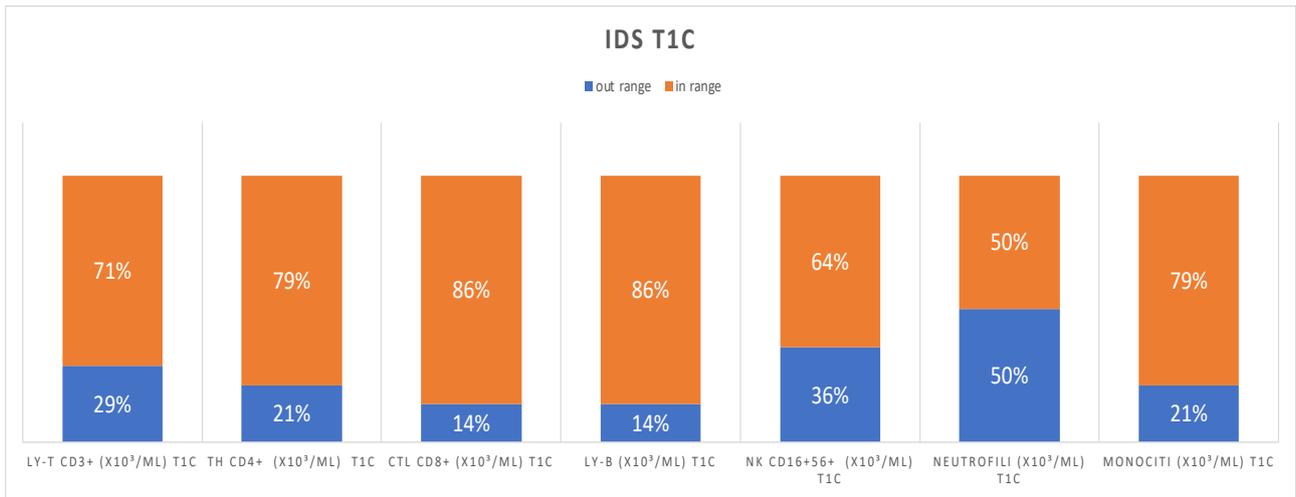


Figura 24. Confronto tra le percentuali dei campioni che rientrano o che non rientrano nei valori di riferimento per le diverse popolazioni leucocitarie nel gruppo IDS al tempo T1C

Confrontando i valori ottenuti ai tre tempi T0 e T1B e T1C, non si riscontra una differenza statisticamente significativa per i linfociti TCD3+, linfociti B+, per le cellule NK, per i neutrofili e per i monociti. Mentre per linfociti T CD4+ (p-value: < 0,006), CD8+ (p-value: < 0,007), esiste una differenza significativa.

Rapporto neutrofili/linfociti (NLR)

È stato, inoltre, preso in esame il rapporto neutrofili/linfociti (NLR) come *marker* di risposta infiammatoria. I dati sono stati ottenuti dividendo il valore in percentuale dei neutrofili per il valore in percentuale dei linfociti. Il grafico riportato in figura 25 mostra i valori di NLR di tutta la popolazione in esame (PDS e IDS) al tempo T0. Il valore medio di NLR delle 67 pazienti è di 10,31, ampiamente superiori al valore di riferimento di 1,95 (linea nera).

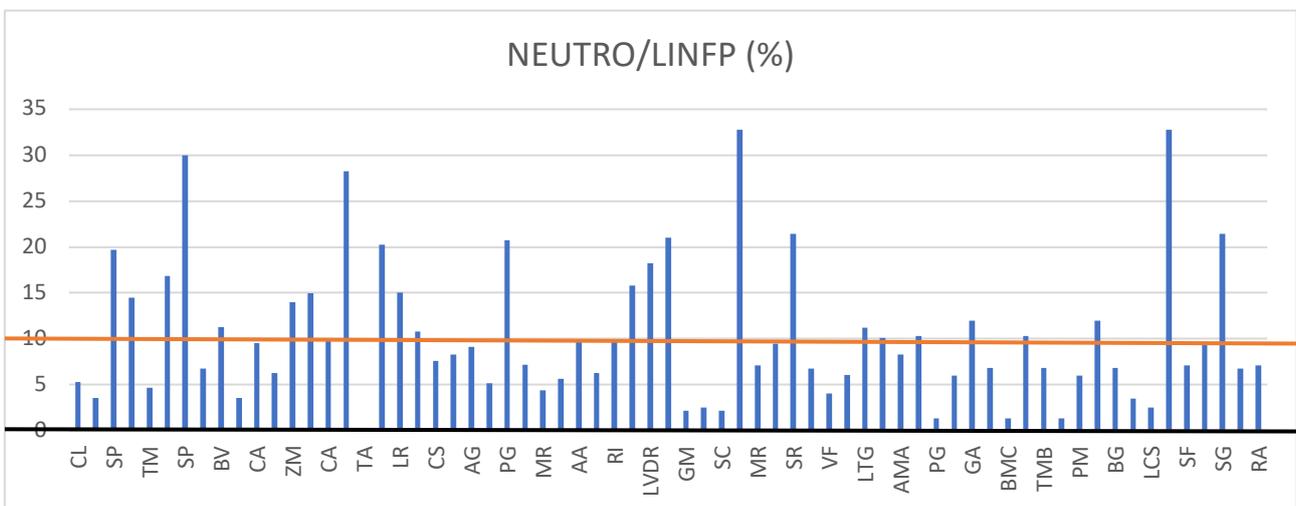


Figura 25. Rapporto neutrofili/linfociti nell'intera coorte di pazienti

Analizzando i due gruppi PDS e IDS separatamente, sono stati calcolati i valori ai vari check point prestabiliti.

Nel gruppo delle PDS al tempo T0, come si evince dal grafico in figura 26, il 100% delle pazienti presenta un NLR al di sopra del valore di riferimento (<1,95 linea nera), con un valore medio di 11,60.

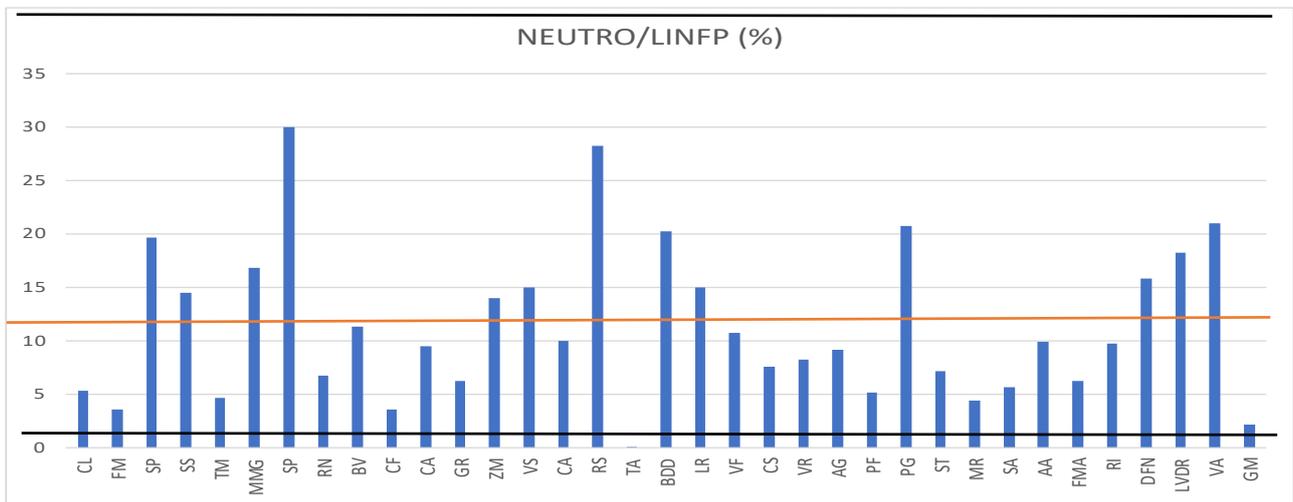


Figura 26. Rapporto neutrofili/linfociti nel gruppo PDS al tempo T0

Il valore è stato ricalcolato anche al tempo T1 (30 giorni dopo la chirurgia - Figura 27). Anche in questo caso il valore medio è di 6,78, al di sopra del valore di riferimento (<1,95 linea nera), ma diminuito rispetto al tempo della diagnosi T0. Confrontando i due dati a disposizione, la riduzione di tale valore di NLR risulta statisticamente significativo con un p-value di 0,007.

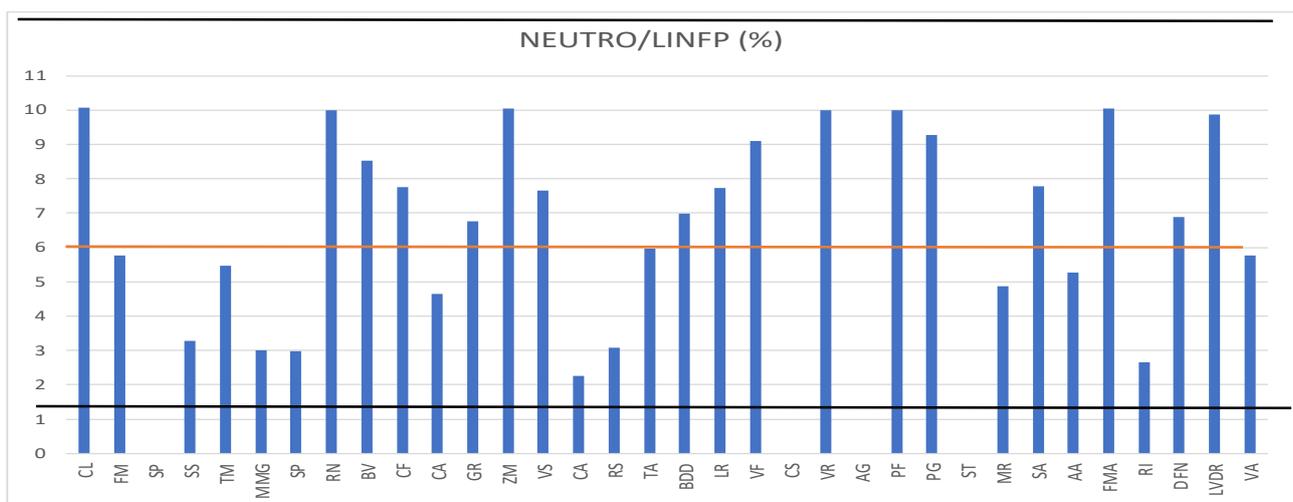


Figura 27. Rapporto neutrofili/linfociti nel gruppo PDS al tempo T1

Nel gruppo IDS il valore di NLR è stato calcolato al tempo T0 (Figura 28) e successivamente al tempo T1B (dopo chemioterapia neoadiuvante- Figura 29) e T1C (30 giorni dopo la chirurgia - Figura 30).

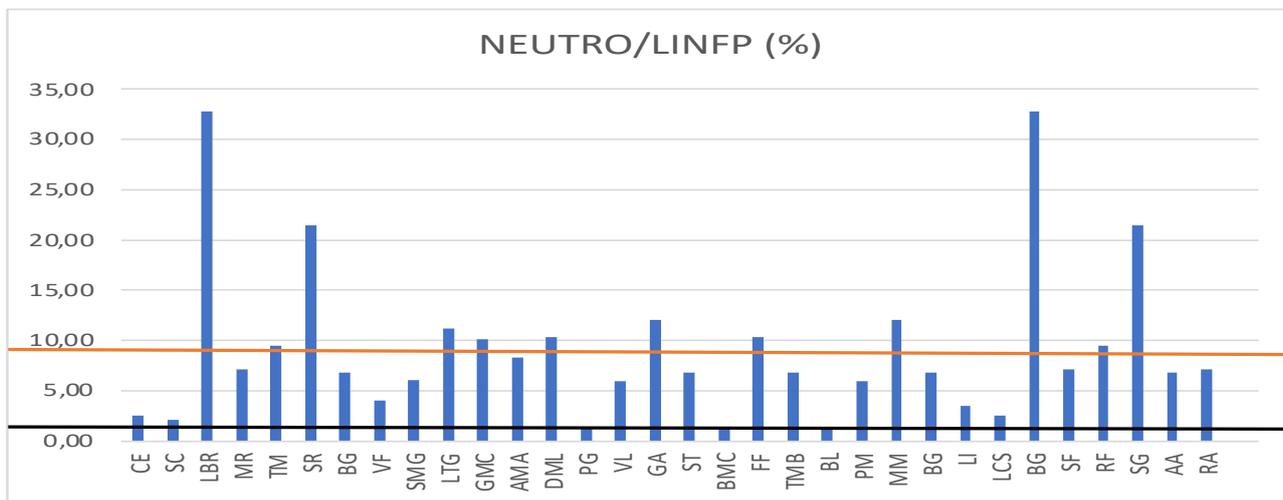


Figura 28. Rapporto neutrofili/linfociti nel gruppo IDS al tempo T0

Al tempo T0 il valore medio di NLR è di 9,19 mentre al tempo T1B e T1C è rispettivamente di 7,51 e di 5,58.

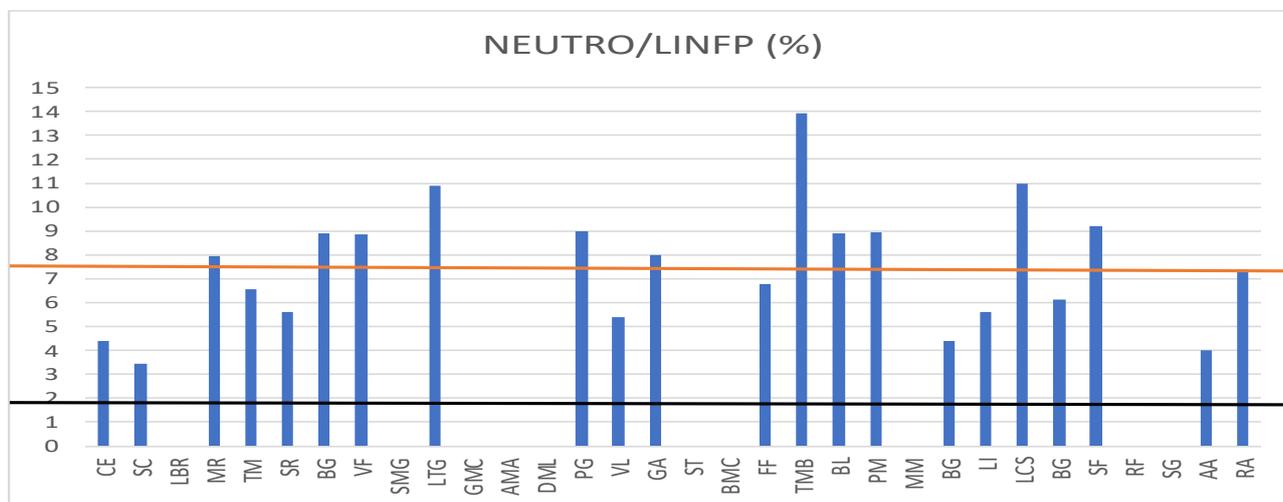


Figura 29. Rapporto neutrofili/linfociti nel gruppo IDS al tempo T1B

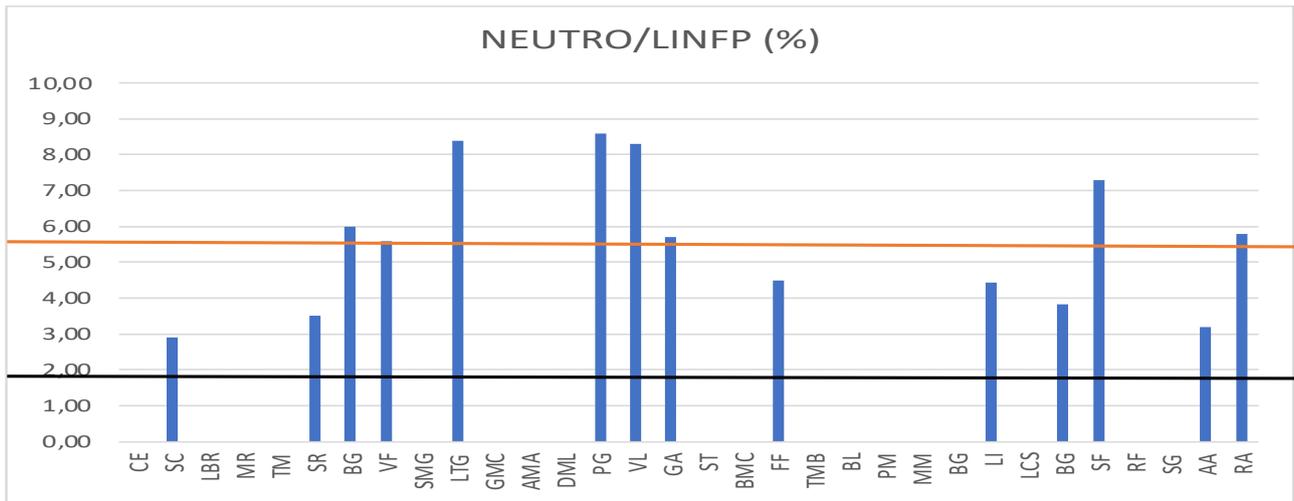


Figura 30. Rapporto neutrofili/linfociti nel gruppo IDS al tempo T1C

Confrontando i dati a disposizione, la riduzione di tale valore di NLR risulta statisticamente significativo con un p-value di 0,04 comparando i dati al tempo T1B -T1C ma non T0-T1C - T0-T1B.

Rapporto CD4+/CD8+

Sempre su sangue periferico è stato calcolato, per ogni paziente, il rapporto CD4+/CD8+ (figura 31), tale rapporto è stato ottenuto dividendo il valore in percentuale dei linfociti T CD4+ per il valore dei linfociti T CD8+. Un rapporto CD4/CD8 è considerato normale quando è compreso tra 1,0 e 2,5. Tale rapporto mostra un valore medio di 2,23 in tutta la popolazione selezionata, rientrando in un range di normalità.

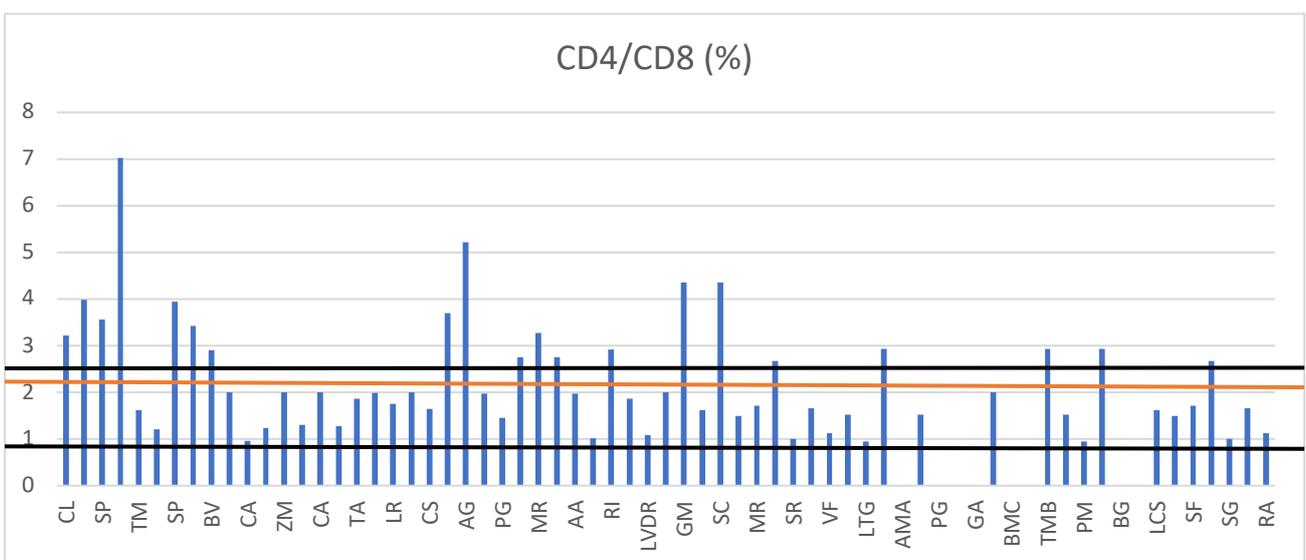


Figura 31. Rapporto CD4/CD8 nell'intera coorte di pazienti al tempo T0

Analizzando separatamente i gruppi, le pazienti PDS mostrano un valore medio di CD4/CD8 al tempo T0 di 2,44 (Figura 32), valore al limite superiore del range di normalità. Tale valore (valore medio 2,5) resta pressochè stabile al tempo T1 (30 giorni dopo chirurgia-Figura 33). La variazione non risulta statisticamente significativa (p-value 0,51)

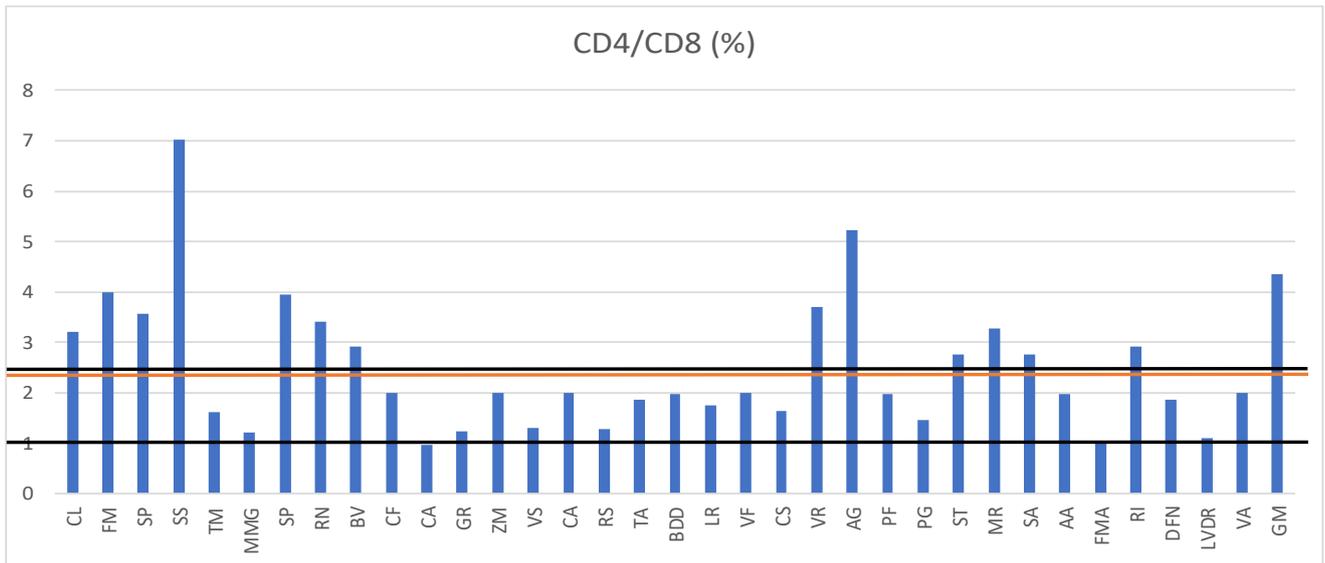


Figura 32. Rapporto CD4/CD8 nel gruppo PDS al tempo T0

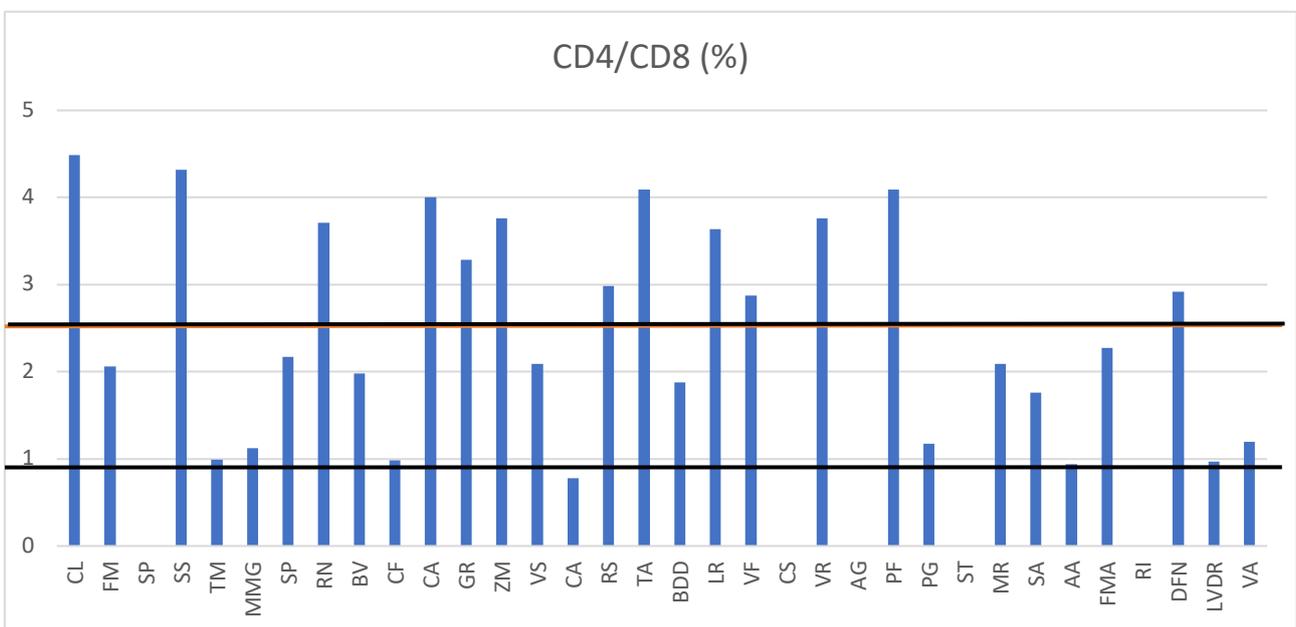


Figura 33. Rapporto CD4/CD8 nel gruppo PDS al tempo T1

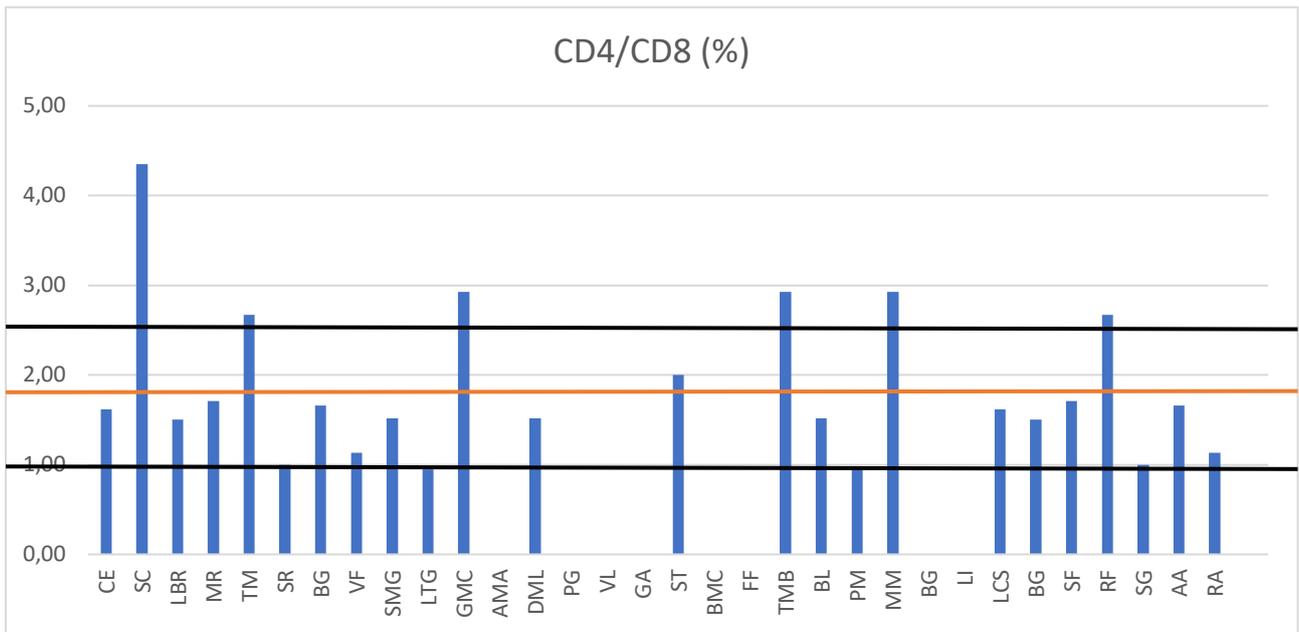


Figura 34. Rapporto CD4/CD8 nel gruppo IDS al tempo T0

A differenza, nel gruppo delle IDS, il valore medio al tempo T0 è di 1,84 (Figura 34) che aumenta a 4,34 al tempo T1B (dopo chemioterapia - Figura 35) e cala nuovamente dopo circa 30 giorni dal trattamento chirurgico (Figura 36). In questo caso esiste una variazione significativa con un p-value di 0,04. Nello specifico risultano significative le differenze ai tempi T0-T1B e T1B-T1C.

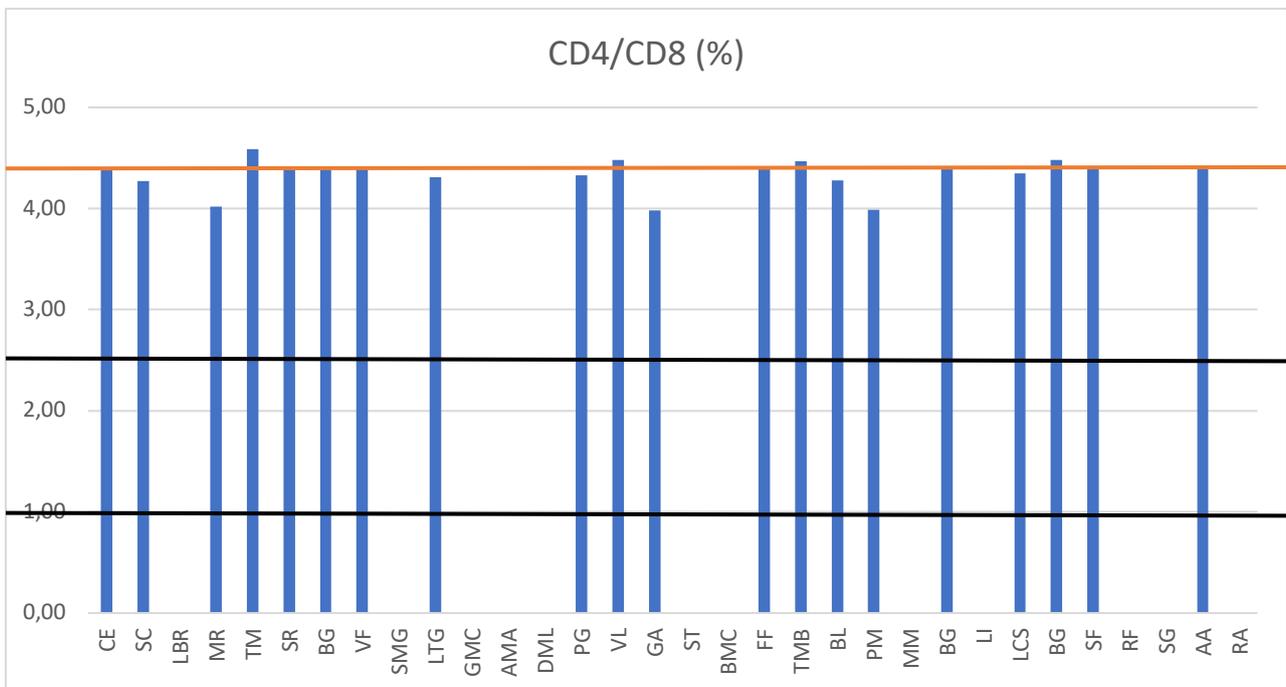


Figura 35. Rapporto CD4/CD8 nel gruppo IDS al tempo T1B

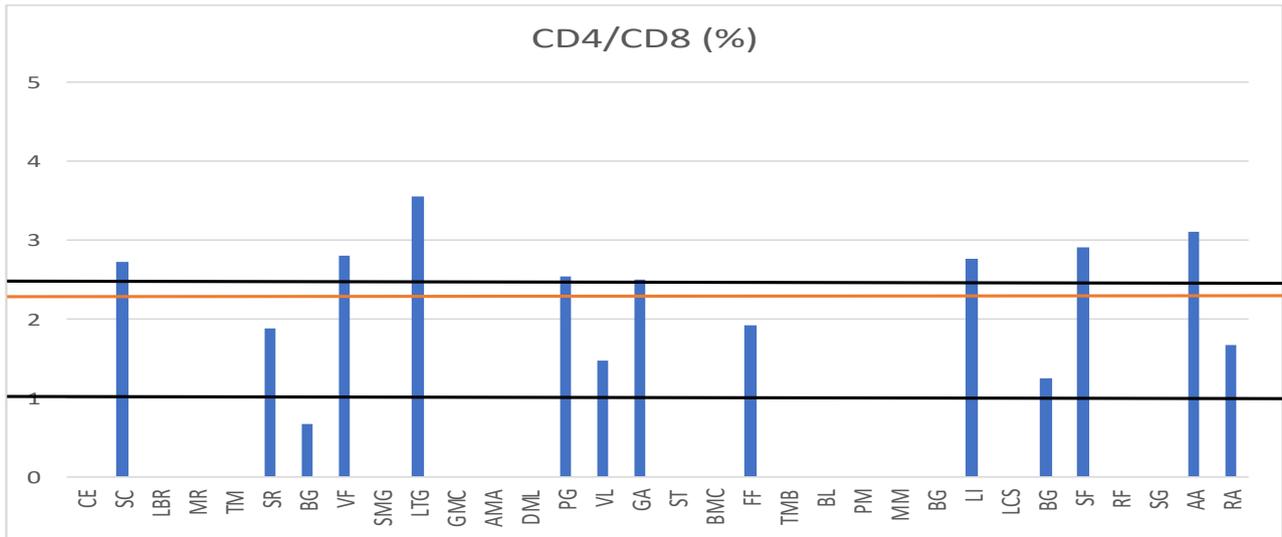


Figura 36. Rapporto CD4/CD8 nel gruppo IDS al tempo T1C

Linfociti T-reg e recettore PD-1

Nell'analisi del sangue periferico è stata considerata la percentuale dei linfociti Treg circolanti (CD4+CD25+). Considerando l'intera popolazione (PDS ed IDS), il valore medio della percentuale dei linfociti Treg corrisponde a 0,96%. Inoltre, è stata valutata anche l'espressione del recettore PD-1 nelle sottopopolazioni linfocitarie T circolanti (CD8+ e CD4+). I linfociti che esprimono PD-1 sono in media il 15,07%. È stata valutata anche l'espressione del ligando di PD-1 ed è stato osservato che, nella maggior parte dei casi, l'espressione di PD-L1 nei linfociti T nel sangue periferico risulta essere al di sotto dell'1% (Figura 37).

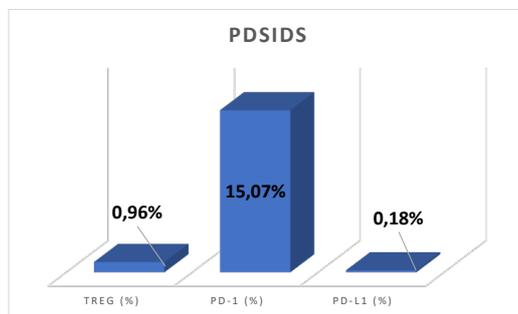


Figura 37. Valore medio (%) dei Treg, PD-1, PD-L1 nell'intera popolazione al tempo T0

Facendo la stessa valutazione separatamente per i due gruppi ai diversi check point, risulta che nelle PDS al tempo T0 e T1 la percentuale dei Treg circolanti è rispettivamente 1,12% e

0,7%. La percentuale dei linfociti che esprimono PD-1 sono rispettivamente 18% e 2,3%, mentre il suo ligando PD-L1 è sempre al di sotto dell'1% (0,04% e 0,01%) (Figura 38).

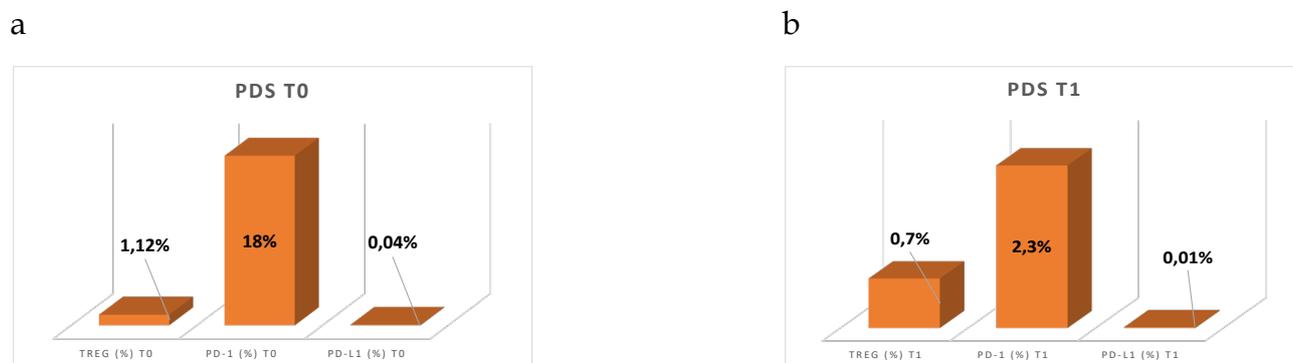


Figura 38. Valore medio (%) dei Treg, PD-1, PD-L1 nel gruppo PDS al tempo T0 (a) e T1 (b)

Confrontando i risultati non esistono differenze statisticamente significative nei valori percentuali ai due tempi T0 e T1 per i linfociti Treg e PD-L1. Mentre risulta statisticamente significativa la differenza tra i valori di PD-1 al tempo T0 e T1 (p-value < 0,01).

Nel gruppo IDS al tempo T0, T1B e T1C la percentuale dei Treg circolanti è rispettivamente 0,76%, 8% e 0,75%. La percentuale dei linfociti che esprimono PD-1 sono rispettivamente 11,7%, 10,4% e 8,2%, mentre i valori percentuali del suo ligando PD-L1 sono ai diversi tempi 0,34%, 0,22% e 0,50% (Figura 39).



Figura 39. Valore medio (%) dei Treg, PD-1, PD-L1 nel gruppo IDS al tempo T0 (a) e T1B (b) e T1C (c)

Anche in questo gruppo è stata eseguita un'analisi di confronto tra i valori in percentuale ottenuti ai diversi tempi T0, T1B e T1C. Non risultano differenze statisticamente significative per PD-1 e PD-L1. Si riscontra una differenza significativa per i valori percentuale dei linfociti Treg (p-value: < 0,002). Nello specifico risultano significative le variazioni tra i tempi T0-T1B (<0,01) e T1B-T1C (<0,01)

5.3 Caratterizzazione dell'infiltrato linfocitario nelle biopsie tumorali

La caratterizzazione dell'infiltrato linfocitario infiltrante il tumore (TILs) è stato eseguito mediante tecnica immunohistochimica. L'analisi è stata eseguita su un prelievo bioptico effettuato a tutte le pazienti al tempo T0. Il valore medio percentuale è stato calcolato per tutta la popolazione e separatamente per il gruppo PDS e IDS.

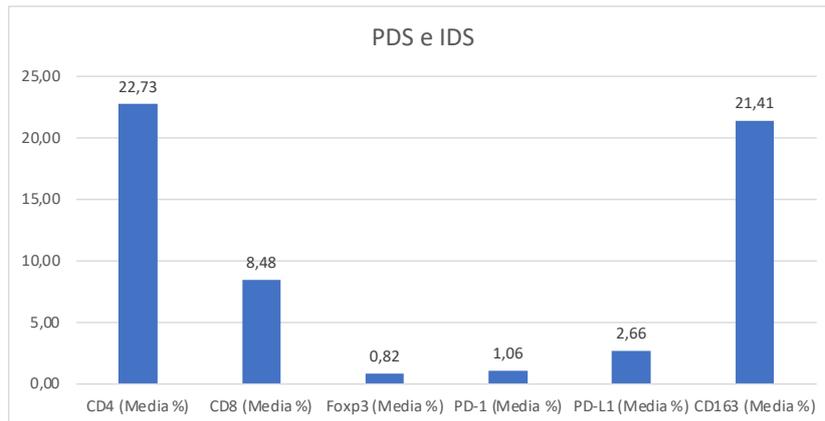


Figura 40. Valore medio (%) dei CD4+, CD8+, FoxP3+, PD-1, PD-L1, CD163 nell'intera popolazione

Nell'intera coorte il valore medio percentuale è rispettivamente: per i CD4+ del 22,73%, per i CD8+ dell'8,48%, per i Treg (Foxp3+) dello 0,82%, per PD-1 dell'1,06%, per PD-L1 del 2,66%, per i CD163 del 21,41% (Figura 40).

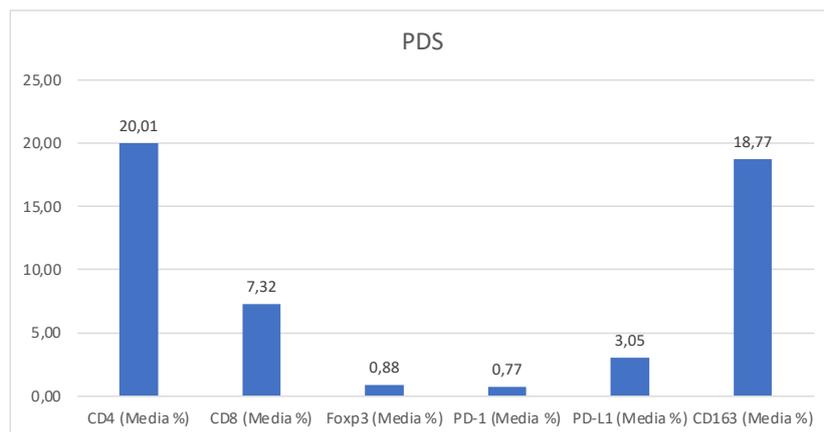


Figura 41. Valore medio (%) dei Cd4+, CD8+, FoxP3+, PD-1, PD-L1, CD163 nel gruppo PDS al tempo T0

Nel gruppo PDS il valore medio percentuale è rispettivamente: per i CD4+ del 20,01%, per i CD8+ del 7,32%, per i Treg (Foxp3+) dello 0,88%, per PD-1 dello 0,77%, per PD-L1 del 3,05%, per i CD163 del 18,77% (Figura 41).

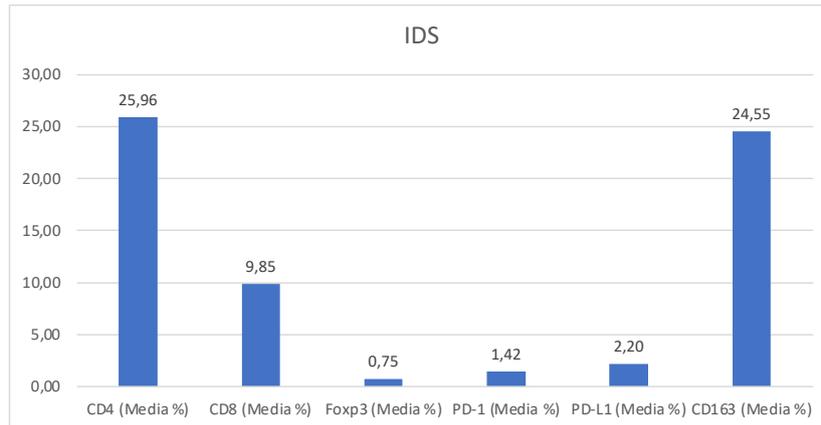


Figura 42. Valore medio (%) dei Cd4+, CD8+, FoxP3+, PD-1, PD-L1, CD163 nel gruppo IDS al tempo T0

Mentre nel gruppo IDS il valore medio percentuale è rispettivamente: per i CD4+ del 25,96%, per i CD8+ del 9,85%, per i Treg (Foxp3+) dello 0,75%, per PD-1 dell'1,42%, per PD-L1 del 2,20%, per i CD163 del 24,55% (Figura 42).

Un ulteriore prelievo è stato eseguito nel gruppo di pazienti sottoposta a chemioterapia neoadiuvante e successiva chirurgia di intervallo. In queste pazienti è stato possibile eseguire un doppio prelievo: uno durante la prima LPS diagnostica e il successivo durante la seconda laparoscopia diagnostica, in concomitanza della procedura citoriduttiva. In questo specifico gruppo è stato possibile comparare i valori della popolazione linfocitaria prima e dopo il trattamento chemioterapico.

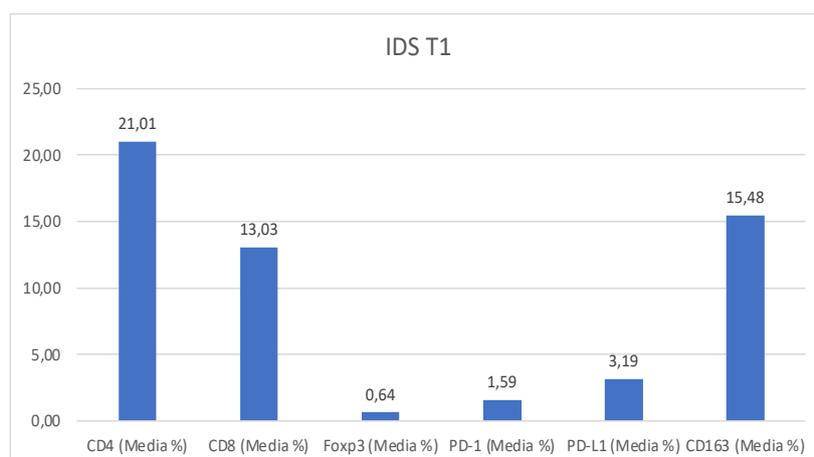


Figura 43. Valore medio (%) dei Cd4+, CD8+, FoxP3+, PD-1, PD-L1, CD163 nel gruppo IDS al tempo T1B

Il valore medio percentuale dopo chemioterapia è rispettivamente: per i CD4+ del 21,01%, per i CD8+ del 13,03%, per i Treg (Foxp3+) dello 0,64%, per PD-1 dell'1,59%, per PD-L1 del 3,19%, per i CD163 del 15,48% (Figura 43).

E' stata eseguita una valutazione della variazione dei valori medi percentuali anche sulle biopsie tumorali pre e post chemioterapia.

La differenza risulta statisticamente significativa sia nei linfociti CD8+, che aumentato in termini percentuali (p-value: 0,05), sia nei monociti CD 163+, che diminuiscono (p-value: < 0,01).

5.4 Analisi di sopravvivenza

Il tempo medio di follow-up è di 12 mesi, con un valore massimo di follow-up di 26 mesi. Durante tutto il periodo di studio sono state registrate 13 recidive: 7 nel gruppo IDS e 6 nel gruppo PDS. Mentre il numero dei decessi è di 15: 4 nel gruppo PDS e 11 nel gruppo IDS.

Variazione della popolazione linfocitaria al tempo T0 - T1 e prognosi

Abbiamo valutato se le variazioni risultate statisticamente significative durante la caratterizzazione della popolazione cellulare immunitaria nei due diversi gruppi PDS e IDS, correlano con un aumento della sopravvivenza globale (OS) e con un aumento dell'intervallo libero da malattia (DFS).

Nel gruppo delle pazienti sottoposte a chirurgia primaria PDS, i risultati al tempo T0-T1 mostrano che la variazione in aumento dei valori di CD3+, CD8+ e cellule NK correlano con un aumento della OS (p-value: < 0,05). All'analisi univariata l'aumento di tali valori correla con un PI più basso alla laparoscopia (p:value: = 0,05).

Non mostrano una correlazione con la OS la variazione dei CD4+ e dei monociti. Mentre nessuna delle variazioni di CD3+, CD4+, CD8+, cellule NK e monociti correla con un aumento della DFS.

Nel gruppo delle IDS nessuna variazione dei CD4+ e dei CD8+, ai tempi T0 - T1C, T0 - T1B, T1B - T1C correla con un aumento dell'OS.

Correlano con un aumento della DFS le variazioni in aumento di CD4+ e CD8+ al tempo T0 -T1B (p value: < 0,05). Nessuna altra variazione ai tempi stabiliti dei prelievi correla con un aumento della DFS. All'univariata queste variazioni correlano con una diminuzione del ca125 post chemioterapia.

Allo stesso modo è stata valutata la correlazione con la OS e la DFS delle variazioni al tempo T0 - T1 dei valori di NLR nelle PDS e al tempo T1B - T1C nelle IDS.

La variazione di NLR non correla con un incremento del tasso di OS (p-value: 0,9) o di DFS (p-value: 0,7) nel gruppo PDS. Anche nel gruppo IDS la variazione di NLR non correla con un miglioramento della OS (p-value: 0,9) ed DFS (p-value: 0,9).

Ulteriormente, considerando il rapporto CD4+/CD8+ ai tempi T0 - T1B e T1B - T1C nel gruppo delle IDS, non è emersa alcuna correlazione con un aumento della OS e DFS.

La variazione dei valori percentuali di PD-1 nel gruppo PDS, non correla né con un aumento della OS né con un aumento della DFS. Nel gruppo IDS, la variazione del valore percentuale delle Treg ai tempi T0 - T1B e T1B - T1C, non è associata con un aumento dell'OS e della DFS.

Popolazione linfocitaria al tempo T0 e prognosi

I valori di CD4+, CD8+, Treg, PD-1, PD-L1 e CD163+ sono stati suddivisi in base al valore medio in due diversi gruppi: CD4+(basso) e CD4+(alto), CD8+(basso) e CD8+(alto), Treg (basso) e Treg (alto), PD-1 (basso) e PD-1(alto), PD-L1(basso) e PD-L1 (alto) e CD163+(basso) e CD163+(alto). All'analisi di sopravvivenza dell'intera popolazione si conferma che un valore alto dei linfociti CD8+ e uno basso dei Treg correla con un miglioramento della sopravvivenza seppur non in maniera significativa. Tale dato viene confermato anche separatamente nei due gruppi PDS e IDS (Figura 44).

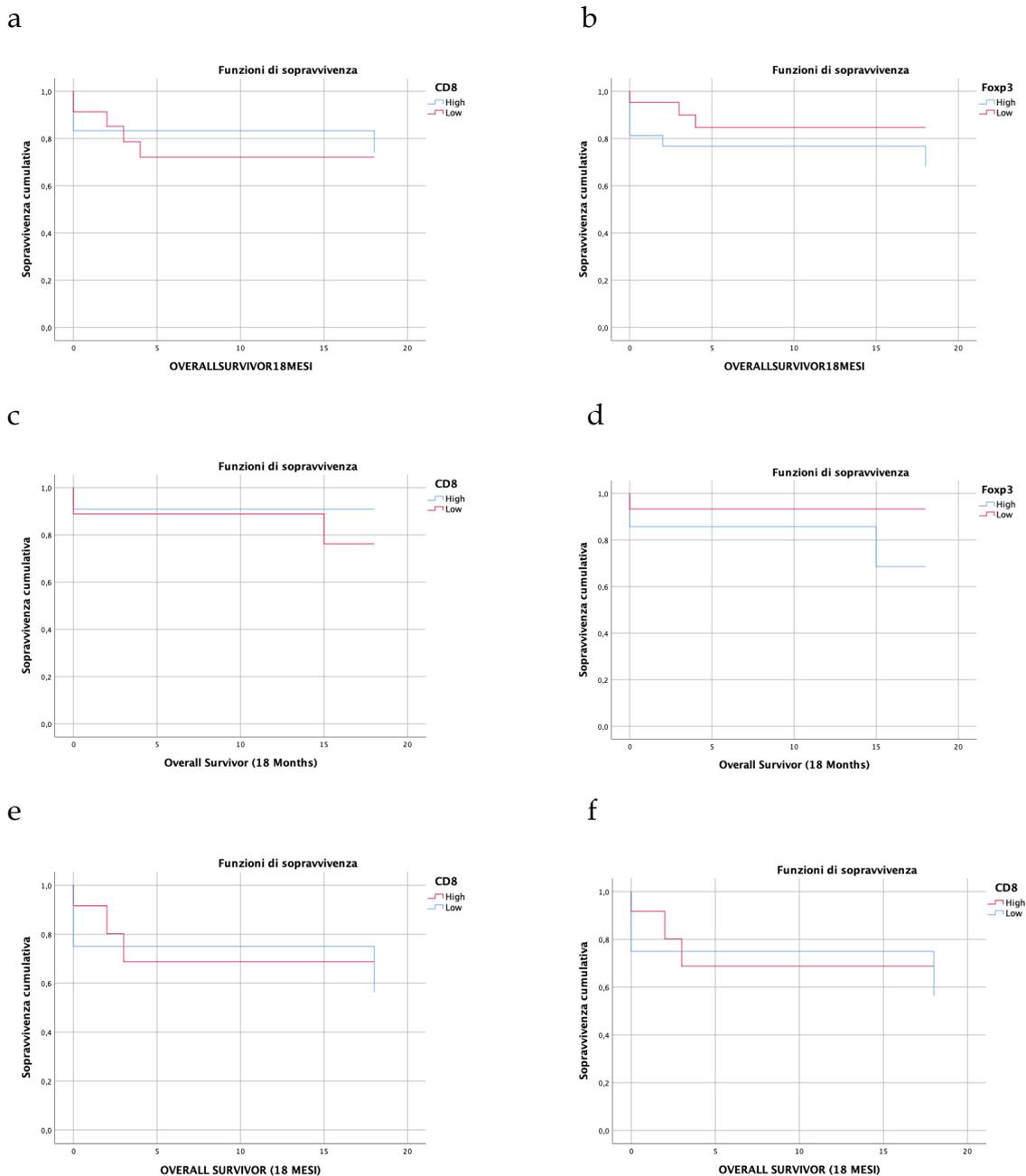


Figura 44. Grafici di sopravvivenza, curve di Kaplan-Meier, nell'intera coorte di pazienti (a, b), nel gruppo PDS (c, d) e nel gruppo IDS (e, f). a) Correlazione della sopravvivenza con CD8+ in base al valore medio alto e basso. b) Correlazione della sopravvivenza con Treg+ in base al valore medio alto e basso. c) Correlazione della sopravvivenza con CD8+ in base al valore medio alto e basso. d) Correlazione della sopravvivenza con Treg+ in base al valore medio alto e basso. e) Correlazione della sopravvivenza con CD8+ in base al valore medio alto e basso. f) Correlazione della sopravvivenza con Treg+ in base al valore medio alto e basso.

Considerando la variazione della densità cellulare intratumorale nelle biopsie eseguite al tempo T0 e T1B nelle pazienti sottoposte a NACT, come già descritto, i linfociti CD8+

aumentano in maniera significativa dopo l'effetto della chemioterapia (p.value: <0,05), mentre i CD163+ diminuiscono (p.value: < 0,01). Questo dato, nello specifico solo una variazione positiva del valore dei CD8+, correla con un aumento della DFS (p value: 0,0427) ma non della OS, valore non riportato (Tabella 4).

	CD4+	CD8+	Foxp3+	PD-1	PD-L1	CD163+
P-value DFS	0,510	0,0427	0,910	0,717	0,9	0,041

Tabella 4: analisi univariata delle variazioni post- NACT delle sottopopolazioni cellulari immunitarie nel gruppo IDS

6 DISCUSSIONE

In questo studio, abbiamo caratterizzato al momento della diagnosi, le sottopopolazioni cellulari immunitarie presenti nel circolo ematico e nel microambiente tumorale di pazienti affette da cancro ovarico avanzato ad istotipo sieroso ed endometrioidi di alto grado. Successivamente abbiamo suddiviso le pazienti in due gruppi, quelle sottoposte a citoreduzione in up-front e quelle sottoposte a chemioterapia neoadiuvante e conseguente chirurgia di intervallo. È stata effettuata un'analisi in citometria a flusso multiparametrica delle principali cellule immunitarie presenti nel circolo periferico, in un gruppo omogeneo di pazienti. Considerando i valori ematici laboratoristici di riferimento dei linfociti T CD3+, CD4+, CD8+, linfociti B+, cellule NK, neutrofili e monociti, sono state valutate le percentuali che ricadono al di fuori dei range di normalità. Negli individui sani questi valori ricadono in un determinato range di normalità e sono sotto un forte controllo genetico, come rilevato in diversi studi⁷⁸⁻⁷⁹. Nei nostri dati, in più del 65% dei casi sono stati riscontrati valori "out of range" per i linfociti T CD3+, CD4+, CD8+ e neutrofili, mentre i linfociti B+, cellule NK e monociti risultano alterati in meno del 40% dei casi. Queste evidenti alterazioni dimostrano chiaramente un importante impatto della malattia sul sistema immunitario.

I pazienti affetti da cancro mostrano spesso valori linfocitari alterati al momento della diagnosi⁸⁰. La conta linfocitaria assoluta (ALC) è stata positivamente associata alla "curabilità" di una varietà di tumori⁸¹. Associazioni simili tra ALC e sopravvivenza sono state riportate per un'ampia varietà di tumori epiteliali, del tessuto connettivo e linfoidi⁸², tra cui il cancro ovarico^{83,84}. Oltre alla sopravvivenza, l'ALC è stata associata alla risposta a diversi trattamenti antitumorali, tra cui la chemioterapia⁸⁵, in tumori epiteliali^{86,87}. In effetti, nell'articolo di Riesco del 1970, egli osservava che "questi risultati concordano con l'idea della partecipazione dei linfociti al meccanismo dell'eventuale fenomeno dell'immunità anticancro"⁸¹. Pertanto, il ristabilirsi di valori linfocitari di normalità nei pazienti neoplastici rappresenterebbe un valido mezzo per promuovere l'immunità tumorale.

Il primo passo è stato porre la nostra attenzione nel definire la densità delle sottopopolazioni in esame, attraverso l'esecuzione di prelievi seriati in tempi prestabiliti. Abbiamo dimostrato le variazioni scaturite dalle diverse modalità di trattamento.

Nelle pazienti del gruppo PDS le sottopopolazioni, CD3+, CD4+, CD8+, e cellule NK esaminate subiscono una netta modifica rientrando nella maggior parte dei casi nei range di normalità con una variazione significativa. Mentre i linfociti B e i neutrofili non subiscono

variazioni statisticamente significative. Va sottolineato che i linfociti B risultavano già al momento diagnostico nella maggior parte dei casi nella norma, mentre i neutrofili, che risultano ancora nella maggior parte dei casi (59%) fuori range di norma, riflettono una risposta infiammatoria sistemica al cancro e potrebbero ancora risultare alterati per effetto dell'insulto chirurgico. Questo risultato è probabilmente dovuto alla riduzione del carico tumorale dopo chirurgia up-front, determinando un effetto positivo sul pannello cellulare immunitario.

All'analisi di sopravvivenza una variazione in aumento dei linfociti CD3+, CD8+ e cellule NK correla con un aumento della sopravvivenza. All'analisi univariata queste variazioni sono associate ad un ridotto PI laparoscopico. Quindi sono le pazienti con un minor carico di malattia e una conseguente maggiore probabilità di citoriduzione ottimale ad avere una maggiore modifica in positivo del sistema immunitario. Questo mostra che la chirurgia e la conseguente riduzione del carico di malattia, favorisce il ristabilirsi delle condizioni di normalità, in pazienti con una densità cellulare ridotta. L'impatto della chirurgia sullo stato del sistema immunitario è stato dimostrato già in diversi tumori, come quello pancreatico⁹² e polmonare⁸⁸.

Nel gruppo delle pazienti sottoposte a NACT più IDS, le popolazioni linfocitarie a subire una variazione statisticamente significativa, confrontando i valori nei diversi tempi prescelti, sono le sottopopolazioni linfocitarie CD4+ e CD8+. Nello specifico tale variazione è però significativa tra i valori al tempo T0 e T1B, ovvero dopo chemioterapia neoadiuvante. All'analisi univariata tale variazione correla con una riduzione del CA 125 post chemioterapia. Questo ulteriore dato, sembrerebbe mostrare come ci sia un rinforzo nell'attività immunitaria grazie al potere farmacologico, determinando una riduzione del carico tumorale. Bisognerebbe identificare quelle pazienti maggiormente suscettibili all'effetto farmacologico capaci di modifiche nel pannello cellulare immunitario. I nostri dati mostrano una correlazione con la riduzione del CA125 post chemio. Pertanto, il debulking farmacologico e quindi la riduzione locale del tumore determina un effetto sistemico, ristabilendo, anche nel gruppo IDS, una valida attività cellulare immunitaria.

Successivamente abbiamo valutato la percentuale dei Treg, e delle proteine PD-1 e PD-L1. I linfociti T regolatori sono noti per avere un effetto negativo sulla sopravvivenza delle pazienti neoplastiche e nello specifico, anche in quelle con carcinoma ovarico.

La funzione immunitaria delle cellule T CD4+ e CD8+ è influenzata dall'espressione di PD-1, riflettendo una soppressione nella attività secretiva di citochine (IFN)- γ , IL-2 e TNF- α .

Pertanto, è stata valutata sempre ai tempi prestabiliti, la percentuale delle Treg, e come indici di esaurimento, l'espressione del recettore PD-1 nelle sottopopolazioni linfocitarie T (CD8+ e CD4+) nei linfociti T circolanti nel sangue periferico e del suo ligando PD-L1. Nel gruppo delle PDS, confrontando le variazioni dei valori percentuali è stata riscontrata una differenza significativa nell'espressione di PD-1. I dati mostrano che in seguito al trattamento chirurgico primario si ha una netta riduzione dei valori di PD-1. Pertanto, anche in questo caso la chirurgia primaria e quindi l'azione locale di eradicazione della malattia sembrerebbe avere un ruolo nella stimolazione e ripresa del sistema immunitario nella sua risposta contro il tumore.

A differenza delle PDS, nel gruppo delle IDS si riscontra una variazione significativa solo nei valori dei linfociti Treg. In questo caso i valori aumenterebbero in maniera significativa dopo chemioterapia per poi diminuire drasticamente dopo il trattamento chirurgico. Anche in questo caso sembrerebbe che sia la citoriduzione d'intervallo a determinare un drastico calo dei valori, promuovendo un abbassamento dei linfociti T-reg, che notoriamente impattano in maniera negativa. Questo dato in parte contrasta con quanto riportato in letteratura, dove la NACT è associata ad una riduzione dei linfociti T regolatori ed a un aumento dei CD8+⁸⁹. Nonostante queste variazioni descritte ai diversi timing siano significative, all'analisi univariata, non esprimono un miglioramento in termini di sopravvivenza e tempo libero da malattia.

Un elevato rapporto tra neutrofili e linfociti (NLR) è stato suggerito come un marker di risposta infiammatoria sistemica ed è stato riconosciuto come indicatore prognostico che potrebbe essere utilizzato nella pratica clinica oncologica quotidiana in vari tipi di cancro, tra i quali anche il carcinoma ovarico. In una review sistematica della letteratura, vengono inclusi 12 studi, per un totale di 3854 pazienti, i risultati hanno mostrato che un valore elevato di NLR pretrattamento è significativamente associato a una sopravvivenza globale (OS) più scarsa (HR: 1,69, IC 95% 1,29-2,22) e a una sopravvivenza libera da progressione (PFS) più breve (HR 1,63, IC 95% 1,27- 2,09). Inoltre, l'aumento del NLR correla con lo stadio FIGO avanzato (OR 2,32, IC 95% 1,79-3,00), livelli sierici più elevati di CA-125 (OR 3,33, IC 95% 2,43-4,58), maggior quantitativo di ascite (OR 3,54, IC 95% 2,31-5,42) così come una minore risposta chemioterapica (OR 0,53, IC 95% 0,40-0,70)⁹⁰.

Nelle pazienti con carcinoma ovarico di questo studio sono stati riscontrati valori di NLR piuttosto elevati, questi valori confermano quanto già detto nei capitoli precedenti e concordano con i dati presenti nella letteratura del settore⁹¹. L'NLR è significativamente

aumentato nei casi di tumore ovarico ed è considerato il secondo marcatore più sensibile nel predire i tumori maligni dopo l'antigene tumorale.

La variazione dell'NLR risulta statisticamente significativa nel gruppo delle PDS con una diminuzione dei valori di NLR dopo il trattamento chirurgico. Mentre nelle IDS la variazione significativa si apprezza tra il tempo T1B e T1C, quindi in seguito alla citoriduzione d'intervallo. Non risulta significativo il confronto tra i valori relativi agli altri tempi prestabiliti.

Sempre su sangue periferico, è stato valutato il rapporto CD4+/CD8+. In questo caso nel gruppo PDS il valore medio rientra in un range di normalità, sia al tempo T0 che dopo il tempo chirurgico, mantenendosi ai limiti superiori. Nelle IDS tale rapporto risulta aumentato dopo chemioterapia rientrando nei valori di normalità dopo la chirurgia d'intervallo. Tale variazione significativa mostra un allontanamento dai criteri di normalità dopo chemioterapia. Distanza che viene ristabilita dopo la chirurgia. I dati mostrati, in considerazione sia dell'aumento mostrato prima dei linfociti T regolatori, che del rapporto CD4+/CD8+, mostrano un'azione antitumorale, con la riduzione del carico di malattia locale, ma allo stesso tempo anche immunosoppressiva sistemica del trattamento chemioterapico. Questo effetto andrebbe sicuramente indagato in futuri lavori.

Da una recente review⁹² si evince che questi biomarcatori hanno un valore predittivo accettabile. Tuttavia, il divario tra la ricerca clinica e le applicazioni cliniche dei marcatori compositi esiste ancora per due ragioni principali. In primo luogo, i loro valori limite non sono stati precisamente determinati. In secondo luogo, questi valori sono facilmente influenzati da diversi fattori confondenti. Pertanto, è necessario un modello di previsione per stabilire e verificare i valori limite di questi biomarcatori compositi. Per generare dati per la costruzione di tale modello è necessario uno studio prospettico multicentrico, che includa un campione di grandi dimensioni e un follow-up garantito.

Inoltre, la stessa review afferma che i cambiamenti dinamici in questi marcatori potrebbero essere di maggiore valore. Le differenze nei tempi di misurazione di questi biomarcatori possono avere implicazioni diverse nell'orientare le terapie cliniche⁹³. Tuttavia, dalla nostra analisi tali variazioni non correlano con un miglioramento di OS e DFS. Probabilmente è necessario aumentare la numerosità del campione e allungare il follow up.

Dai dati complessivi mostrati, si potrebbe ipotizzare che la riduzione e soprattutto l'effettiva rimozione del carico tumorale rappresenti il *primum movens* per un ripristino e di conseguenza, uno stimolo per il sistema immunitario sistemico. In particolare, la chirurgia

con la sua azione locale, attraverso la macroscopica rimozione del carico tumorale, risulta maggiormente associata a delle modifiche favorevoli del sistema immunitario.

Nel nostro percorso abbiamo caratterizzato anche l'infiltrato cellulare immunitario a livello locale, ipotizzando una correlazione tra il microambiente tumorale e il pannello linfocitario sistemico.

Nel microambiente tumorale, secondo quanto riportato in letteratura, il valore dei TILs (CD4+, CD8+, Treg) e di CD163+, si è visto avere un valore prognostico positivo o negativo sulla sopravvivenza di queste pazienti.

Il microambiente tumorale gioca un ruolo fondamentale nella progressione e nella diffusione del carcinoma ovarico ed una sua miglior conoscenza potrebbe essere quindi di grande ausilio per la definizione di future strategie terapeutiche per il cancro ovarico. Abbiamo già sottolineato che il cancro ovarico è una malattia immunogenica che può essere riconosciuta dal sistema immunitario dell'ospite, pertanto, negli ultimi anni è stato svolto molto lavoro nel rilevamento e nella caratterizzazione dei linfociti infiltranti il tumore (TILs) nel carcinoma ovarico.

Abbiamo analizzato, utilizzando l'immunoistochimica, il valore di queste popolazioni, in tutta la coorte di pazienti e poi differenziandole nei due gruppi di trattamento. Solo nel gruppo delle pazienti sottoposte a chemioterapia neoadiuvante, in cui è stato possibile eseguire due differenti prelievi bioptici, abbiamo valutato il valore dei TILs nel microambiente tumorale prima e dopo il trattamento, rispettivamente durante la prima laparoscopia diagnostica e successivamente durante la chirurgia d'intervallo, analizzando le conseguenti variazioni.

Nella popolazione generale e nei due gruppi è stata riscontrato nel microambiente tumorale una maggiore presenza di linfociti CD4+, CD8+ e di macrofagi. Un valore più alto di linfociti infiltranti il tumore (CD4+, CD8+), e un valore più basso di Treg, rispetto al valore medio, in pazienti con carcinoma ovarico ha un valore prognostico favorevole e, in particolare, contribuiscono agli effetti antitumorali, migliorando la sopravvivenza. All'analisi delle variazioni pre e post chemioterapia, solo la variazione positiva, quindi un aumento percentuale del valore dei CD8+ correla con un aumento della PFS ma non dell'OS.

Si potrebbe ipotizzare che i pazienti con sostanziali modifiche nella densità delle sottopopolazioni linfocitarie possano sviluppare risposte immunitarie più forti contro il loro tumore, con conseguente aumento dei TILs e prolungamento della sopravvivenza.

Fondamentale è quindi riuscire a identificare dei fattori indipendenti, determinanti le variazioni positive del pannello cellulare immunitario periferico, in modo da poter selezionare correttamente le pazienti che potrebbero godere maggiormente di un trattamento immunoterapico.

Ad oggi l'immunoterapia è un approccio promettente per la gestione di diverse neoplasie. È particolarmente utile per i tumori che non rispondono alle terapie convenzionali, come molti tumori avanzati. L'efficacia dell'immunoterapia dipende da molti fattori, uno dei quali è l'immunocompetenza dell'ospite. Come dimostrato i pazienti con tumori primari avanzati sono spesso "immuno-alterati", il che li rende scarsi candidati per l'immunoterapia. La rimozione chirurgica ha determinato un rimodellamento del sistema immunitario ripristinando l'immunocompetenza in pazienti con malattia metastatica disseminata. Tale effetto è maggiore rispettivamente nelle pazienti con un PI e PCI laparoscopico più basso alla diagnosi nel gruppo delle PDS e quelle con una riduzione del CA 125 post chemioterapia nel gruppo delle IDS.

7 CONCLUSIONE

Il pannello cellulare delle sottopopolazioni immunitarie nel circolo sistemico e nel microambiente tumorale del carcinoma ovarico è altamente complesso. Come è emerso anche da questo studio, la composizione delle cellule immunitarie presenti a livello periferico e nel microambiente tumorale può variare in modo significativo tra le diverse pazienti con lo stesso tipo di cancro, suggerendo che la composizione ematica e degli infiltrati immunitari locali e del loro stato funzionale è essenziale per le risposte antitumorali. È noto che le neoplasie hanno sviluppato strategie per eludere le naturali difese immunitarie dell'ospite, esprimendo molecole di superficie in grado di reclutare cellule dell'immunità che sopprimono le risposte immuni effettrici. Negli ultimi anni, l'analisi delle dinamiche di *immune escape* messe in atto dal tumore ha portato all'individuazione di nuovi target molecolari, come i recettori inibitori PD-1, pertanto, i linfociti infiltranti il tumore rappresentano la fonte di riferimento per lo studio dell'attività linfocitaria tumore-specifica e dall'analisi dei TILs ci aspetta di raggiungere uno scenario futuro dove la terapia del carcinoma ovarico sia sempre più personalizzata e adattabile nel tempo su una base di dati biologici predittivi.

Alla luce dell'eterogeneità e della complessità biologica di queste neoplasie la sfida più importante è quella di individuare il *setting* clinico per ogni paziente al fine di ottimizzare la personalizzazione delle terapie con auspicabili miglioramenti degli *outcomes* clinici. In questo contesto l'analisi citofluorimetrica consente, in tempi relativamente brevi (max 48h), la caratterizzazione immunofenotipica, per singolo paziente, del quadro linfocitario sistemico e potrebbe essere utilizzata anche nella caratterizzazione dei linfociti infiltranti il tumore con risultati estremamente affidabili e ripetibili.

Alla luce di quanto emerso l'azione locale della rimozione completa del carico tumorale, soprattutto dopo l'azione chirurgica sia nel setting delle pazienti operate in up-front che nelle pazienti operate dopo chemioterapia determina un effetto positivo sull'azione immunitaria antitumorale, "rigenerando" le cellule immunitarie con azione antitumorale.

BIBLIOGRAFIA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.
2. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. *Cancer statistics, 2023*. *CA Cancer J Clin*. 2023 Jan;73(1):17-48. doi: 10.3322/caac.21763. PMID: 36633525.
3. *I NUMERI DEL CANCRO IN ITALIA 2021*. <https://www.aiom.it/i-numeri-del-cancro-in-italia/>
4. Momenimovahed, Z. et al. *Ovarian cancer in the world: Epidemiology and risk factors*. *International Journal of Women's Health* vol. 11, 287–299 (2019).
5. *Ovarian Cancer Prognosis - From NCI* <https://www.ocrahope.org>
6. Reid, B.M., Permuth, J.B. & Sellers, T.A. *Epidemiology of ovarian cancer: a review*. *Cancer Biology and Medicine* vol. 14, 9–32 (2017).
7. *Linee guida TUMORI DELL'OVAIO. (2021)*. <https://www.aiom.it/linee-guida-aiom-tumori-dellovaio-2021>
8. Kumar, V., Fausto, N., Abbas, A.K. & Aster, J.C. *Robbins e Cotran. Le basi patologiche delle malattie. Malattie degli organi e degli apparati*. vol. 2 (2010).
9. Meinhold-Heerlein, I. et al. *The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications*. *Archives of Gynecology and Obstetrics* vol. 293, 695–700 (2016).
10. Prat, J., D'Angelo, E. & Espinosa, I. *Ovarian carcinomas: at least five different diseases with distinct histological features and molecular genetics*. *Human Pathology* vol. 80, 11–27 (2018).
11. Gilks, C.B. & Prat, J. *Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances*. *Human Pathology* vol. 40, 1213–1223 (2009).
12. van Baal JOAM, van Noorden CJF, Nieuwland R, et al. *Development of Peritoneal Carcinomatosis in Epithelial Ovarian Cancer: A Review*. *J Histochem Cytochem*. 2018;66(2):67-83. doi:10.1369/0022155417742897
13. G.D. Alletti, et al., *Aggressive surgical effort and improved survival in advanced-stage ovarian cancer*, *Obstet. Gynecol.* 107 (1) (2006) 77-85.
14. R.F. Ozols, et al., *Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a gynecologic oncology group study*, *J. Clin. Oncol.* 21 (17) (2003) 3194-3200.
15. Vergote I, Trope' CG, Amant F, et al. *European Organization for Research and Treatment of Cancer–Gynaecological Cancer Group; NCIC Clinical Trials Group. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer*. *N Engl J Med*. 2012; 363:943–53.
16. Morrison J, Haldar K, Kehoe S, Lawrie TA. *Chemotherapy versus surgery for initial treatment in advanced ovarian epithelial cancer*. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;(8):CD005343.
17. Mann WJ, Chalas EJ, Valea FA. *Epithelial ovarian cancer: Initial surgical management*. In: Goff B, ed. In: *UpToDate*. Waltham, MA., 2013.
18. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH. *Regulatory CD4(C)CD25(C) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer*. *Cancer Res* 2001; 61:4766–72; PMID:11406550
19. Landrum LM, Java J, Mathews CA, Lanneau GS, Jr., Copeland LJ, Armstrong DK, Walker JL. *Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer treated with intraperitoneal chemotherapy: A Gynecologic Oncology Group study*. *Gynecol Oncol* 2013; 130:12–8; PMID:23578540; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.04.001>

20. Winter WE, 3rd, Maxwell GL, Tian C, Carlson JW, Ozols RF, Rose PG, Markman M, Armstrong DK, Muggia F, McGuire WP, et al. Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2007; 25:3621–7; PMID:17704411; <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2006.10.2517>
21. Turner TB, Buchsbaum DJ, Straughn JM Jr, Randall TD, Arend RC. Ovarian cancer and the immune system - The role of targeted therapies. *Gynecol Oncol.* 2016 Aug;142(2):349-56. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.05.007. Epub 2016 May 23. PMID: 27174875.
22. Pontieri, G.M., Russo, M.A. & Frate, L. *Patologia Generale. vol. 1* (Piccin Editore, 2009).
23. Tlsty, T.D. & Coussens, L.M. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annual Review of Pathology vol. 1*, 119–150 (2006).
24. Anderson, N. M. & Simon, M. C. The tumor microenvironment. *Current Biology vol. 30* (2020).
25. Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity vol. 21* (2004).
26. Santoiemma, P.P. & Powell, D.J. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Cancer Biology and Therapy vol. 16*, 807–820 (2015).
27. Anderson, N. M. & Simon, M. C. The tumor microenvironment. *Current Biology vol. 30* (2020).
28. Whiteside, T.L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene vol. 27*, 5904–5912 (2008).
29. Fridman, W.H. et al. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology vol. 14*, 717–734 (2017).
30. Ribatti, D. The concept of immune surveillance against tumors: The first theories. *Oncotarget vol. 8*, 7175–7180 (2017).
31. García-Tejido, P. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer: The future of immune targeting. *Clinical Medicine Insights: Oncology vol. 10*, 31–39 (2016).
32. Mittal, D. et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology vol. 27*, 16–25 (2014).
33. Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity vol. 21* (2004).
34. Swann, J.B. & Smyth, M.J. Immune surveillance of tumors. *Journal of Clinical Investigation vol. 117*, 1137–1146 (2007).
35. Teng, M.W.L. et al. From mice to humans: Developments in cancer immunoediting. *Journal of Clinical Investigation vol. 125*, 3338–3346 (2015).
36. Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D. The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology vol. 22*, 329–360 (2004).
37. Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology vol. 121*, 1–14 (2007).
38. Matsuzaki, J. et al. Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proceedings of the National*
39. Schreiber, R.D., Old, L.J. & Smyth, M.J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science, vol. 331(6024)*, 1565–1570 (2011)
40. DeLeeuw, R.J. et al. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: A critical review of the literature. *Clinical Cancer Research vol. 18*, 3022–3029 (2012).
41. Badalamenti, G. et al. Role of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with solid tumors: Can a drop dig a stone? *Cellular Immunology vol. 343* (2019).
42. Ghoneum, A. et al. Role of tumor microenvironment in ovarian cancer pathobiology. *Oncotarget vol. 9*, 22832–22849 (2018).
43. Cai, D.L. & Jin, L.P. Immune cell population in ovarian tumor microenvironment. *Journal of Cancer vol. 8*, 2915–2923 (2017).

44. Drakes, M.L. & Stiff, P.J. Regulation of ovarian cancer prognosis by immune cells in the tumor microenvironment. *Cancers* vol. 10 (2018).
45. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. *Immunologia cellulare e molecolare*. (Edra S.p.A., 2015).
46. Chraa, D. et al. T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes. *Journal of Leukocyte Biology* vol. 105, 243–255 (2019).
47. Balkwill, F.R., Capasso, M. & Hagemann, T. The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science* vol. 125, 5591–5596 (2012).
48. Bilska, M. et al. Th17 Cells and IL-17 As Novel Immune Targets in Ovarian Cancer Therapy. *Journal of Oncology* 2020, (2020).
49. Curiel, T.J. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine* 10, 942–949 (2004).
50. Downs-Canner, S. et al. Suppressive IL-17A+ Foxp3+ and ex-Th17 IL-17A^{neg} Foxp3+ Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells. *Nature Communications* vol. 8, (2017).
51. Worzfeld, T. et al. The unique molecular and cellular microenvironment of Ovarian cancer. *Frontiers in Oncology* vol. 7, (2017).
52. Huang, Y. et al. CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget* vol. 6(19), 17462–17478 (2015).
53. Giuntoli, R.L. et al. Ovarian Cancer-associated Ascites Demonstrates Altered Immune Environment: Implications for Antitumor Immunity. *Anticancer Research* 29, (2009).
54. Rodriguez, G.M. et al. The tumor microenvironment of epithelial ovarian cancer and its influence on response to immunotherapy. *Cancers* vol. 10 (2018).
55. Gaillard, S.L., Secord, A.A. & Monk, B. The role of immune checkpoint inhibition in the treatment of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology Research and Practice* vol. 3 (2016).
56. Baci, D. et al. The ovarian cancer tumor immune microenvironment (Time) as target for therapy: A focus on innate immunity cells as therapeutic effectors. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21 (2020).
57. Malmberg, K.J. et al. Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer. *Seminars in Immunology* vol. 3,1 20–29 (2017).
58. Cózar, B. et al. Tumor-infiltrating natural killer cells. *Cancer Discovery* vol. 11, 34–44 (2021).
59. Melaiu, O. et al. Influence of the Tumor Microenvironment on NK Cell Function in Solid Tumors. *Frontiers in Immunology* vol. 10 (2020).
60. Nersesian, S. et al. Naturally Killing the Silent Killer: NK Cell-Based Immunotherapy for Ovarian Cancer. *Frontiers in immunology* vol. 10, 1782 (2019).
61. Gupta, P. et al. B Cells as an immune-regulatory signature in ovarian Cancer. *Cancers* vol. 11 (2019).
62. Tsou, P. et al. The emerging role of b cells in tumor immunity. *Cancer Research* vol. 76, 5591–5601 (2016).
63. Arneth, B. Tumor microenvironment. *Medicina (Lithuania)* vol. 56 (2020).
64. Guo, F.F. & Cui, J.W. The role of tumor-infiltrating B cells in tumor immunity. *Journal of Oncology* 2019, (2019).
65. Shen, M. et al. Positive and negative functions of B lymphocytes in tumors. *Oncotarget* vol. 7, 55828–55839 (2016)
66. Dyck, L. & Mills, K.H. G. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *European Journal of Immunology* vol. 47, 765–779 (2017).
67. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* vol. 12, 252–264 (2012).
68. Iwai, Y., Hamanishi, J., Chamoto, K. & Honjo, T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *Journal of Biomedical Science* vol. 24 (2017).

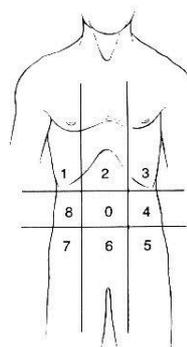
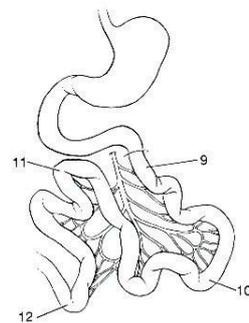
69. Park, Y.J., Kuen, D.S. & Chung, Y. Future prospects of immune checkpoint blockade in cancer: from response prediction to overcoming resistance. *Experimental and Molecular Medicine* vol. 50 (2018).
70. Huang, R.-Y. et al. LAG3 and PD1 co-inhibitory molecules collaborate to limit CD8 + T cell signaling and dampen antitumor immunity in a murine ovarian cancer model. *Oncotarget*. Vol. 6(29), 27359-27377 (2015).
71. Howard, R., Kanetsky, P.A. & Egan, K.M. Exploring the prognostic value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in cancer. *Scientific Reports* 9, (2019).
72. Cho, H. et al. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment. *Cancer Immunology, Immunotherapy* vol. 58, 15–23 (2009).
73. Templeton, A.J. et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* vol. 106 (2014).
74. Citofluorimetria. <https://labtestsonline.it/citofluorimetria>.
75. Porretti Laura & Mariani Mariagabriella. La citofluorimetria e le sue applicazioni in immunoematologia. *Transfusion Medicine Network* (2014).
76. Società Italiana di Citometria. <http://www.citometriagic.it/index.htm>.
77. Karst, A.M. & Drapkin, R. Ovarian Cancer Pathogenesis: A Model in Evolution. *Journal of Oncology* 2010, 1–13 (2010).
78. Bain B, Seed M, Godsland I: Normal values for peripheral blood white cell counts in women of four different ethnic origins. *J Clin Pathol* 1984, 37:188-193.
79. Evans DM, Frazer IH, Martin NG: Genetic and environmental causes of variation in basal levels of blood cells. *Twin Res* 1999, 2:250-257.
80. Porrata LF, Markovic SN: Is absolute lymphocyte count just another prognostic factor in cancer? *SRX Medicine* 2010 2010 [<http://www.hindawi.com/archive/2010/812304/>].
81. Riesco A: Five-year cancer cure: relation to total amount of peripheral lymphocytes and neutrophils. *Cancer* 1970, 25:135-140.
82. Ray-Coquard I, Cropet C, Van Glabbeke M, Sebban C, Le Cesne A, Judson I, Tredan O, Verweij J, Biron P, Labidi I, et al: Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer Res* 2009, 69:5383-5391.
83. Wolff JP, de Oliveira CF: Lymphocytes in patients with ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1975, 45:656-658.
84. Cho H, Hur HW, Kim SW, Kim SH, Kim JH, Kim YT, Lee K: Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment. *Cancer Immunol Immunother* 2009, 58:15-23.
85. Lissoni P, Brivio F, Fumagalli L, Messina G, Ghezzi V, Frontini L, Giani L, Vaghi M, Ardizzioia A, Gardani GS: Efficacy of cancer chemotherapy in relation to the pretreatment number of lymphocytes in patients with metastatic solid tumors. *Int J Biol Markers* 2004, 19:135-140.
86. Nieto Y, Shpall EJ, McNiece IK, Nawaz S, Beaudet J, Rosinski S, Pellom J, Slat- Vasquez V, McSweeney PA, Bearman SI, et al: Prognostic analysis of early lymphocyte recovery in patients with advanced breast cancer receiving high-dose chemotherapy with an autologous hematopoietic progenitor cell transplant. *Clin Cancer Res* 2004, 10:5076-5086.
87. Ferrandina G, Pierelli L, Perillo A, Rutella S, Ludovisi M, Leone G, Mancuso S, Scambia G: Lymphocyte recovery in advanced ovarian cancer patients after high-dose chemotherapy and peripheral blood stem cell plus growth factor support: clinical implications. *Clin Cancer Res* 2003, 9:195-200.
88. Xu YF, Lu Y, Cheng H, Shi S, Xu J, Long J, et al. Abnormal distribution of peripheral lymphocyte subsets induced by PDAC modulates overall survival. *Pancreatology*. 2014; 14:295–301
89. Napoletano C, Bellati F, Landi R, Pauselli S, Marchetti C, Visconti V, Sale P, Liberati M, Rughetti A, Frati L, Panici PB, Nuti M. Ovarian cancer cytoreduction induces changes in T cell population subsets reducing immunosuppression. *J Cell Mol Med*. 2010 Dec;14(12):2748-59. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00911. x. PMID: 19780872; PMCID: PMC3822725.

90. Huang QT, Zhou L, Zeng WJ, Ma QQ, Wang W, Zhong M, Yu YH. Prognostic Significance of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(6):2411-2418. doi: 10.1159/000475911. Epub 2017 May 3. PMID: 28467978.
91. Nosotti M, Rosso L, Mendogni P, Palleschi A, Tosi D, Bonara P, et al. Leuko- cyte subsets dynamics following open pulmonary lobectomy for lung cancer: a prospective, observational study. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2011; 13:262–6.
92. Seckin KD, Karsh MF, Yucel B, Bestel M, Yildirim D, Canaz E, et al. The utility of tumor markers and neutrophil lymphocyte ratio in patients with an intraoperative diagnosis of mucinous borderline ovarian tumor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016; 196:60–3. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2015.10.025>.
93. Zhang CL, Jiang XC, Li Y, Pan X, Gao MQ, Chen Y, Pang B. Independent predictive value of blood inflammatory composite markers in ovarian cancer: recent clinical evidence and perspective focusing on NLR and PLR. *J Ovarian Res*. 2023 Feb 9;16(1):36. doi: 10.1186/s13048-023-01116-2. PMID: 36759864; PMCID: PMC9912515.

APPENDICE 1

Peritoneal Cancer Index (PCI). The index will be calculated as the sum of the lesion size of the tumour in all the abdominopelvic regions involved by carcinomatosis. The score of the PCI ranged from 1 to 39 and will be calculated for each patient.

Peritoneal Cancer Index

	<p>Regions</p> <p>0 Central 1 Right Upper 2 Epigastrium 3 Left Upper 4 Left Flank 5 Left Lower 6 Pelvis 7 Right Lower 8 Right Flank</p> <p>9 Upper Jejunum 10 Lower Jejunum 11 Upper Ileum 12 Lower Ileum</p>	<p>Lesion Size</p> <p>_____ _____ _____</p>	<p>Lesion Size Score</p> <p>LS 0 No tumor seen LS 1 Tumor up to 0.5 cm LS 2 Tumor up to 5.0 cm LS 3 Tumor > 5.0 cm or confluence</p>
	<p>PCI</p> <p><input type="text"/></p>		

APPENDICE 2

Laparoscopic scoring system

to assess the possibility of tumor resection to zero residual (from Fagotti A, et al. Ann Surg Oncol. 2006 Aug;13(8):1156-61; modified).

Peritoneal carcinosis	score 0: carcinosis involving limited araea
	score 2: patients with unresectable massive peritoneal involmente as well with miliary pattern of distribution
Diaphragmatic disease	score 0: small isolated nodules
	score 2: widespread infiltrating carcinosis or confluent nodules to the most part of the
Stomach infiltration	score 0: disease free

	score 2: obvious neoplastic involvement of the gastric wall is observed
Liver metastasis	score 0: disease free
	score 2: surface lesions
Omental disease	score 0: isolated localization
	score 2: large infiltrating nodules or an involvement of the root of the mesentery are supposed on the basis of limited movements of the various intestinal segments
Bowel infiltration	score 0: disease free
	score 2: bowel resection is assumed or when miliary carcinosis on the ansae is observed

APPENDICE 3

ECOG PERFORMANCE STATUS

These scales and criteria are used by doctors and researchers to assess how a patient's disease is progressing, assess how the disease affects the daily living abilities of the patient, and determine appropriate treatment and prognosis. They are included here for health care professionals to access.

Grade	ECOG
0	Fully active, able to carry on all pre-disease performance without restriction
1	Restricted in physically strenuous activity but ambulatory and able to carry out work of a light or sedentary nature, e.g., light housework, office work
2	Ambulatory and capable of all selfcare but unable to carry out any work activities. Up and about more than 50% of waking hours
3	Capable of only limited selfcare, confined to bed or chair more than 50% of waking hours
4	Completely disabled. Cannot carry on any selfcare. Totally confined to bed or chair
5	Dead

