



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Scuola di Medicina e Chirurgia - Dipartimento di Medicina - DIMED  
Corso di Laurea in  
Tecniche di Laboratorio Biomedico  
Presidente: Chiarissimo Prof. Matteo Fassan

TESI DI LAUREA

TITOLO: VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA DI PD-L1 CON CLONE SP142 IN 43  
CASI DI CARCINOMA MAMMARIO.

Relatore: Prof. Fassan Matteo

Correlatore: Dott.ssa Reghellin Daniela

Laureanda/Laureando: Dongilli Cristina  
Matricola: 1236084

Anno Accademico 2021 – 2022



# INDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>6</b>
Epidemiologia del carcinoma della mammella.....	6
Fattori di rischio.....	6
Istologia del carcinoma della mammella.....	7
Fattori prognostico-predittivi.....	8
Classificazione molecolare del tumore al seno.....	9
Carcinoma mammario triplo negativo.....	10
Microambiente tumorale.....	10
PD-1.....	12
PD-L1.....	13
Immunoterapia.....	13
Immunoistochimica.....	14
<b>SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>16</b>
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>17</b>
Valutazione immunoistochimica di PD-L1 con test Ventana SP142.....	17
Metodica.....	18
Interpretazione.....	23
Valutazione immunoistochimica dell'indice di proliferazione Ki67.....	27
Valutazione immunoistochimica dei recettori per gli Estrogeni.....	28
Valutazione immunoistochimica dei recettori per il Progesterone.....	29
<b>RISULTATI</b> .....	<b>31</b>
<b>DISCUSSIONE</b> .....	<b>40</b>
<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>45</b>

## **ABSTRACT**

### Introduzione

Il carcinoma mammario triplo-negativo (negatività per Recettori Estrogeno e Progesterone e per HER2) rappresenta il 15-20% di tutti i carcinomi della mammella; esso ha una prognosi tendenzialmente più sfavorevole rispetto agli altri carcinomi mammari e non può beneficiare della terapia ormonosoppressiva. Atezolizumab è un immunoterapico inibitore del checkpoint immunitario PD-L1. Recentemente, in pazienti con carcinoma mammario triplo-negativo non resecabile, localmente avanzato o metastatico è stato approvato l'utilizzo di Atezolizumab in combinazione con il chemioterapico Nab-Paclitaxel. Requisito indispensabile per effettuare questa terapia è la valutazione di PD-L1 nelle cellule immunitarie intratumorali (IC) utilizzando la metodica immunoistochimica con anticorpo Ventana SP142. Il valore soglia per la positività di PD-L1 (IC) è dell'1%.

### Scopo dello studio

Scopo di questa tesi è stato quello di descrivere la metodica immunoistochimica di allestimento e di valutazione di PD-L1 (SP142), analizzando la sua espressione in carcinomi mammari triplo-negativi (TNBC) sia primitivi che metastatici e di correlarlo con le caratteristiche del microambiente tumorale, in particolare con i linfociti infiltranti il tumore (TILs). A questo scopo, è stata rivalutata la casistica disponibile presso l'UOC di Anatomia Patologica dell'Ospedale "San Bortolo" di Vicenza, relativa al periodo compreso tra marzo 2019 e aprile 2022.

### Materiali e metodi

L'analisi è stata condotta su 43 casi di carcinomi della mammella triplo-negativi, relativi a 41 pazienti, tutte di sesso femminile. Tutti i campioni sono stati analizzati con lo strumento BenchMar ULTRA ICH Ventana-Roche Diagnostics. Il test Ventana SP142 utilizza un anticorpo primario monoclonale di coniglio anti-PD-L1 per riconoscere la proteina PD-L1; prevede l'utilizzo di OptiView DAB ICH Detection Kit e OptiView Amplification Kit. Il primo è un sistema indiretto privo di biotina che rileva l'anticorpo primario di coniglio legato all'antigene, impiegando un anticorpo terziario marcato enzimaticamente, che si lega all'anticorpo secondario diretto contro l'anticorpo primario. Il secondo è progettato per generare un aumento del segnale degli anticorpi primari colorati con Optiview DAB ICH Detection Kit.

## Risultati

I risultati ottenuti concordano con quanto descritto in Letteratura in quanto nella maggior parte dei casi sia i carcinomi primitivi sia che quelli metastatici studiati sono risultati PD-L1 positivi (IC $\geq$  1%). È stata confermata anche la correlazione esistente tra stato di PD-L1 e valore di TILs: tra le neoplasie con PD-L1 positivo, TILs aveva più frequentemente un valore compreso tra 10 e 40%, mentre tra quelle con PD-L1 negativo, TILs era con maggior frequenza più basso, cioè <10%. Infine, tutti i casi con un valore alto di TILs (>40%), sono risultati PD- L1 positivi

## Conclusioni

La valutazione immunohistochimica di PD-L1 con clone Ventana SP142 nel carcinoma della mammella triplo-negativo in fase avanzata o metastatica è un requisito indispensabile per la somministrazione della terapia combinata Atezolizumab/Nab-paclitaxel. In tale analisi risultano critiche sia la fase pre-analitica che analitica. Le caratteristiche della casistica studiata, sono in linea con quanto descritto in Letteratura.

## INTRODUZIONE

### **Epidemiologia del carcinoma della mammella**

Il carcinoma della mammella è la neoplasia femminile più frequente nei Paesi occidentali ed è la maggior causa di morbilità e mortalità oncologiche. L'incidenza del cancro mammario presenta un'ampia variabilità geografica, con tassi fino a 10 volte più elevati nei Paesi economicamente più avanzati rispetto ai Paesi in via di sviluppo. Non considerando i carcinomi cutanei, globalmente, il carcinoma mammario è la neoplasia più diagnosticata nelle donne, in cui circa un tumore maligno ogni tre (29%) è un tumore mammario.

Solo nel 2020 in Italia sono stati diagnosticati 55500 nuovi casi di carcinoma della mammella, 55000 nelle donne e 500 negli uomini. Il tasso di incidenza nella fascia di età fino ai 49 anni risulta essere del 41%, del 35% tra i 50 e i 69 anni e del 22% nelle donne con età maggiore o uguale a 70 anni. [1] Nel 2020 ci sono stati 12500 decessi per carcinoma della mammella; esso rappresenta la prima causa di morte per tumore nelle donne, anche se si osserva una continua tendenza alla diminuzione della mortalità per carcinoma mammario (0,8%/anno), attribuibile a una maggiore diffusione dei programmi di *screening*, e conseguenti diagnosi più precoci, e ai progressi terapeutici. La sopravvivenza a 5 anni delle donne con tumore della mammella in Italia è pari all'88%. A causa dell'alta incidenza e della relativa buona prognosi, il tumore della mammella è quello con una maggiore prevalenza nel mondo; In Italia la stima dei dati mostra una chiara tendenza all'incremento, dai circa 100.000 casi annui nel 1970, ai 350.000 casi nel 1997, ai circa 420.000 casi nel 2005, fino a 834.200 casi nel 2020. Tale incremento è attribuibile sia all'aumento della sopravvivenza che all'invecchiamento della popolazione.

### **Fattori di rischio**

Il rischio di contrarre un carcinoma mammario aumenta con l'aumentare dell'età a causa del continuo stimolo proliferativo endocrino che subisce l'epitelio mammario in concomitanza con il progressivo danno al DNA e al continuo accumulo di mutazioni epigenetiche con una perdita di equilibrio nell'espressione tra oncogeni e geni oncosoppressori.

Altri fattori di rischio per lo sviluppo del carcinoma della mammella sono una lunga durata del periodo fertile, che determina una più lunga esposizione dell'epitelio ghiandolare agli stimoli proliferativi degli estrogeni e il mancato o breve allattamento al seno. Nelle donne una gravidanza precoce, cioè prima dei vent'anni, riduce del 50% la probabilità di sviluppare un tumore mammario e le gravidanze successive aumentano la protezione contro il cancro del 10%. L'effetto protettivo della gravidanza non è evidente nelle donne che invece hanno la loro prima gravidanza tra i 30 e i 34 anni, mentre il rischio aumenta se la prima gravidanza avviene dopo i 35 anni. [2]

Il rischio aumenta anche nei primi 5 anni di assunzione di terapia endocrina sostitutiva durante la menopausa e diventa maggiore se la terapia è basata sulla combinazione di estrogeni e progesterone rispetto alla terapia con soli estrogeni. [3]

Anche l'esposizione a radioterapia precedente, come nel caso di donne trattate in giovane età nell'area del torace con regime radioterapico per linfoma di Hodgkin, aumenta il rischio fino a sette volte di sviluppare un carcinoma della mammella. [4]

Inoltre, un elevato consumo di alcol, lipidi e proteine animali ed il basso consumo di fibre vegetali sono associati ad aumentato rischio di carcinoma mammario. Un errato regime alimentare che porta all'insorgenza dell'obesità è un fattore di rischio riconosciuto, probabilmente legato all'eccesso di tessuto adiposo che soprattutto in postmenopausa rappresenta la principale fonte di sintesi di estrogeni circolanti, con conseguente eccessivo stimolo ormonale sulla ghiandola mammaria. Molto importante è anche l'esercizio fisico, che contribuisce al mantenimento di un buono stato di salute generale. [5]

L'ereditarietà infine è un fattore di rischio molto importante: il 5-7 % dei carcinomi mammari risulta essere legato a fattori ereditari e tra questi fondamentali è la mutazione dei geni BRCA1 e BRCA2. Nelle donne portatrici di mutazioni del gene BRCA1 il rischio di sviluppare un carcinoma della mammella è pari al 65%, nelle donne con mutazioni del gene BRCA2 il rischio risulta essere del 40%. Altre patologie ereditarie associate ad un maggiore rischio di carcinoma della mammella sono la sindrome di Li-Fraumeni, con la mutazione della proteina p53, la sindrome di Cowden, con la mutazione di PTEN, e la sindrome di Peutz-Jeghers. [1]

### **Istologia del carcinoma della mammella**

Nella mammella possono insorgere diversi tipi di tumore; nella maggioranza dei casi si tratta di tumori epiteliali, cioè di carcinomi. Il carcinoma della mammella origina dalle cellule che rivestono i dotti e i lobuli mammari e viene classificato istologicamente in base alla morfologia osservata al microscopio ottico e alla presenza o meno di infiltrazione stromale (neoplasia "in situ" o infiltrante). Si parla di carcinoma "in situ" quando le cellule tumorali si trovano ancora nella sede dove è avvenuta l'iniziale trasformazione neoplastica; il carcinoma "in situ" non ha ancora superato la membrana basale, quindi non ha la possibilità di entrare in contatto con vasi sanguigni o linfatici, per tale motivo non può dare metastasi linfonodali o a distanza. Esistono due tipi di carcinoma "in situ": carcinoma duttale "in situ" e carcinoma lobulare "in situ".

Il carcinoma diviene infiltrante nel momento in cui supera la membrana basale ed acquisisce quindi la potenzialità di dare embolizzazione dei vasi e quindi metastasi linfonodali e a distanza. Nel 90-95% dei casi il carcinoma infiltrante della mammella è di tipo duttale (NST secondo l'ultima

classificazione WHO) o lobulare. Nel rimanente 5-10% dei casi il carcinoma mammario presenta altri istotipi (es. carcinoma mucinoso, carcinoma tubulare, carcinoma metaplastico, etc.)

### **Fattori prognostico-predittivi**

Nella valutazione del carcinoma della mammella risulta fondamentale dare un'indicazione dei seguenti fattori, sia dal punto di vista prognostico, che predittivo alla risposta a terapia. Questo per guidare il Clinico nella scelta della terapia più opportuna:

- dimensione del tumore
- stato dei linfonodi ascellari
- grado istologico: il carcinoma della mammella viene gradato in G1 - ben differenziato, G2 - moderatamente differenziato e G3 – scarsamente differenziato secondo il il Nottingham Grading System che valuta: la differenziazione ghiandolare quantificando la formazione di tubuli e ghiandole; il pleomorfismo nucleare; la conta mitotica (Cfr. tab. I). Un grado elevato (G3) rappresenta un fattore prognostico sfavorevole [7, 8]

Tabella 1 (modificata da WHO Classification of Tumours Editorial Board. Breast Tumours. WHO classification of tumours 5th edition, Volume 2. 2019)

<b>Caratteristica</b>	<b>Punteggio</b>
<b>Formazione di tubuli e ghiandole</b>	
>75% della neoplasia	1
10-75% della neoplasia	2
<10% della neoplasia	3
<b>Pleomorfismo nucleare</b>	
cellule piccole, regolari, uniformi	1
incremento moderato della taglia	2
incremento marcato della taglia e disomogeneità	3
<b>Conta mitotica</b>	
secondo l'area di campo del microscopio	1-3
<b>Punteggio totale</b>	
3-5	G1
6-7	G2
8-9	G3



- attività proliferativa: valutata con metodica immunohistochimica indicando che percentuale di cellule neoplastiche esprime ki67
- la presenza di embolizzazione neoplastica endovascolare
- la presenza di una componente “in situ” associata alla neoplasia infiltrante
- istotipo
- stato dei recettori ormonali per estrogeno (ER) e progesterone (PR) valutato con metodica immunohistochimica: questi antigeni sono localizzati nei nuclei delle cellule. Nel caso del carcinoma della mammella possono costituire importanti regolatori di crescita. La presenza di ER a livello nucleare nei tumori della mammella può essere predittiva di responsività alla terapia ormonale con Tamoxifene o inibitori delle aromatasi. Sono considerati positivi i tumori con almeno l'1% delle cellule neoplastiche positive e questi beneficiano della terapia endocrina. Secondo le ultime indicazioni ASCO/CAP, i carcinomi della mammella con una positività per ER <10% sono considerati “ER low”. [9]
- stato di HER2: la sovraespressione della proteina HER2, individuata con metodica immunohistochimica e/o l'amplificazione genica del gene HER2, evidenziata con metodica di ibridazione in situ, rappresentano un fattore prognostico e predittivo di risposta ai farmaci anti-HER2. [10]
- multifocalità: presenza di più focolai di tumore
- linfociti infiltranti il tumore (TILs): carcinomi mammari con un elevato infiltrato linfocitario stromale intratumorale, specie se HER2-positivi o triplo-negativi presentano una prognosi migliore rispetto a carcinomi dello stesso tipo ma con un basso livello di linfociti. Il carcinoma mammario triplo-negativo e il carcinoma HER2 positivo mostrano in media un TILs più alto.[11, 12]

### **Classificazione molecolare del tumore al seno**

Da un punto di vista molecolare il carcinoma della mammella è eterogeneo, con differenti *pattern* di espressione genica che portano diversità nel comportamento della neoplasia e nella prognosi.

Ci sono stati, negli ultimi anni, molti tentativi di classificare da un punto di vista molecolare il carcinoma mammario, per cercare di adattare il più possibile la terapia a ciascun tipo di neoplasia.

Tuttavia, da un punto di vista economico e di tempistiche, nella maggior parte delle Istituzioni si utilizza una classificazione surrogata a quella molecolare che si basa sulla valutazione di biomarcatori immunohistochimici (ER, PR, HER2 e Ki67). Tale classificazione permette di suddividere il carcinoma della mammella in cinque sottotipi:

1-LUMINALI A: ER e PR positivi, HER2 negativi, basso Ki67

2-LUMINALI B (HER2-NEGATIVI): ER positivi, HER2 negativi, PR negativi o a bassa espressione e/o alto Ki67

3-LUMINALI B (HER2-POSITIVI): ER positivi, HER2 positivi, qualsiasi status di PR e Ki67

4-HER2-POSITIVI (NON LUMINALI): HER2 positivi, ER e PR negativi

5- TRIPLO NEGATIVI: ER e PR negativi, HER2 negativi

### **Carcinoma mammario triplo negativo**

Il carcinoma mammario triplo negativo (TNBC) rappresenta il 15-20% di tutti i tipi di tumore della mammella ed è generalmente una malattia più aggressiva, con una prognosi più sfavorevole e un grado più elevato rispetto ad altri tipi di tumore mammario. La sopravvivenza globale (OS) mediana della malattia è di 10,2 mesi con le terapie attuali, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni del 65% circa per i tumori in stadio precoce e dell'11% per quelli che si sono diffusi a distanza.[13]

Il TNBC è caratterizzato da una negatività immunoistochimica per ER e PR e da una negatività immunoistochimica e/o all'ibridazione in situ di HER2.[14]

Utilizzando dati di espressione genica, il TNBC può essere classificato in quattro sottotipi: *luminal Androgen Receptor* (LAR), *mesenchymal* (MES), *basal-like immuno-suppressed* (BLIS), *basal-like immuno-activated* (BLIA). Quest'ultimo è considerato il più responsivo dal punto di vista immunoterapico perché il tumore tende a sovra-regolare i geni che controllano la funzione delle cellule B, T e NK. Nel sottotipo BLIS invece il tumore tende a inibire l'espressione di molecole che controllano la presentazione dell'antigene, la differenziazione immuno-cellulare e la risposta innata e adattativa immunitaria.[15]

### **Microambiente tumorale**

La composizione del microambiente tumorale varia in base ai diversi tipi di tumore ma le componenti comuni includono le cellule immunitarie, che lasciano il circolo sanguigno per entrare nello stroma tumorale, le cellule stromali, i vasi sanguigni e la matrice extracellulare. Le cellule tumorali stimolano profondi cambiamenti del punto di vista cellulare e molecolare nel tessuto coinvolto. [16]

Le cellule immunitarie si possono dividere in due categorie: quelle che fanno parte del sistema adattativo e quelle del sistema innato. L'immunità adattativa è attivata dall'esposizione a specifici antigeni e si basa sulla memoria immunologica per attuare una risposta immunitaria. Mettono in atto la risposta adattativa i linfociti T, i linfociti B e i linfociti *Natural Killer*. L'immunità innata è un meccanismo di difesa aspecifico attuato da macrofagi, granulociti e cellule dendritiche.

Inizialmente l'infiltrato linfocitario intratumorale (TILs) svolge un ruolo di immunosorveglianza, distruggendo i neoantigeni tumorali, fino a quando il sistema immunitario non riesce più a contrastare il tumore; le cellule tumorali eludono le difese immunitarie attraverso un processo chiamato *immunoediting*, con conseguente progressione tumorale, che permette di creare dei cloni tumorali scarsamente immunogenici. L'*immunoediting*, comprende tre fasi in sequenza:

eliminazione, che può determinare la completa distruzione della lesione tumorale da parte del sistema immunitario; equilibrio: le cellule tumorali sopravvissute, attraverso un processo di selezione operato dai linfociti T, diventano resistenti al controllo di “sorveglianza”; evasione: le cellule tumorali si diffondono in modo incontrollato.

Le cellule immunitarie sono quindi una componente fondamentale nel microambiente tumorale e possono provvedere sia alla soppressione della crescita tumorale ma anche alla sua promozione. Nel carcinoma della mammella, è stato riscontrato che i TILs sono composti principalmente da cellule T CD4+ e CD8+, seguite da cellule B, macrofagi, cellule NK e cellule dendritiche. [16, 17] Nello studio dei TILs è importante considerare sia la densità dell'infiltrato ma anche il fenotipo cellulare. [18] Le cellule T CD8+, ovvero citotossiche, riconoscono gli antigeni tumorali espressi sulle cellule cancerogene e li distruggono, quindi la presenza di cellule T citotossiche nel microambiente tumorale è spesso associato a una prognosi positiva nei pazienti affetti. Inoltre la presenza di cellule T citotossiche sopprime la angiogenesi attraverso la secrezione di interferon gamma. I linfociti CD4+, ovvero T Helper, sono cellule pro-infiammatorie che supportano l'azione dei linfociti T citotossici attraverso la secrezione di interleuchina 2 e interferon gamma; la presenza di essi nel microambiente tumorale è associata con una migliore prognosi in molti tipi di cancro. Le cellule T regolatorie sono normalmente attivate per sopprimere invece la risposta immunitaria e controllare l'autoimmunità. Le cellule T regolatorie CD4+ (che esprimono il fattore di trascrizione FOXP3) funzionano principalmente mediando l'immunosoppressione attraverso l'inibizione delle cellule T effettrici tramite citochine come TGF- $\beta$  e IL-10. Coerentemente, la presenza di T REG CD4+ FOXP3+ nel tumore triplo-negativo è associata a una prognosi peggiore. Questi meccanismi di regolazione negativa da parte delle cellule T REG comprendono la sovraespressione di molecole di *checkpoint* inibitorie, il reclutamento di cellule immunosoppressive, la produzione di fattori soppressivi nel microambiente tumorale e la riduzione della presentazione dell'antigene. Questi meccanismi sono considerati di interesse terapeutico perché la loro manipolazione può fornire un mezzo per potenziare le risposte immunitarie antitumorali.

L'attivazione delle cellule T richiede l'aggancio del TCR (recettore delle cellule T) e del CD28 (recettore co-stimolatorio) sulle molecole MHC e B7, rispettivamente, espresse dalle cellule presentanti l'antigene. In assenza di co-stimolazione o in presenza di un segnale co-inibitorio (al posto di quello co-stimolatorio), le cellule immunitarie diventano anergiche o muoiono per apoptosi. I recettori che forniscono segnali co-inibitori funzionano come "*checkpoint* immunitario" e il loro ruolo è quello di mantenere la tolleranza periferica e di prevenire l'autoimmunità [19]. Nei tumori, i segnali co-inibitori ostacolano la risposta immunitaria antitumorale bloccando sia l'attivazione degli effettori immunitari da parte delle cellule presentanti l'antigene sia la fase di riconoscimento immunitario delle cellule tumorali da parte degli effettori immunitari. I recettori co-inibitori sono

sovraregolati sulle cellule T (PD-1) a causa della persistente e continua stimolazione indotta dall'infiammazione cronica associata ai tumori [20]. Anche le cellule tumorali possono esprimere diverse molecole di questi recettori co-inibitori. La sovraregolazione di questi recettori è legata a un processo adattativo (chiamato "resistenza immunitaria adattativa") indotto dall'infiltrazione di cellule immunitarie e sfruttato dai tumori per limitare l'infiammazione e proteggersi dall'attacco immunitario.

In base alla densità dei TILs, il microambiente tumorale si può suddividere in tre categorie: *immune infiltrated*, dove i TILs sono omogeneamente distribuiti; *immune excluded*, dove i TILs si trovano alla periferia del tumore e non hanno infiltrato il microambiente tumorale; *immune silent*, con assenza di infiltrato linfocitario. [21]

La quantità di cellule infiltranti il tumore determina diversi esiti clinici: un aumento del numero di cellule immunitarie è correlato a un esito clinico favorevole in varie neoplasie, come il melanoma, il cancro del colon-retto, del polmone e della mammella. Le cellule immunitarie nei tumori solidi sono in grado di esercitare un'influenza sul comportamento delle cellule tumorali e lo sviluppo della malattia maligna deriva, in una certa misura, dall'interazione bidirezionale tra le cellule tumorali e il loro microambiente immunitario. Diventa quindi fondamentale la caratterizzazione del compartimento immunitario e la quantificazione dei TILs sia come fattore prognostico che predittivo alla terapia. [22]

## **PD-1**

PD-1 (Programmed Death-1) è uno dei recettori co-inibitori, o *checkpoint* immunitari, più studiati. PD-1, indicato anche come CD279, è stato scoperto per la prima volta in linee cellulari LyD9 (progenitore ematopoietico murino) e 2B4-11 (ibridoma a cellule T murino) deprivate di interleuchina-3 (IL-3) nel 1992. PD-1 è una proteina transmembrana da 55 kDa contenente 288 aminoacidi con un dominio N-terminale extracellulare (IgV-Like), un dominio permeante la membrana e una coda citoplasmatica situata rispettivamente alle estremità N e C, con due basi di tirosina. PD-1 è un inibitore della risposta immunitaria sia adattativa che innata ed è espresso dai linfociti T attivati, dalle cellule *natural killer* (NK), dai linfociti B, dai macrofagi, dalle cellule dendritiche e dai monociti. In particolare, PD-1 viene espresso dalle cellule T in seguito alla loro attivazione dovuta a stati di stimolazione cronica come le infezioni croniche o le neoplasie. In queste situazioni, PD-1 svolge un ruolo chiave nel ridurre le risposte immunitarie inefficaci o dannose e nel mantenere la tolleranza immunitaria. Tuttavia, con il suo effetto immunosoppressore, nel contesto di un microambiente tumorale, PD-1 favorisce la crescita delle cellule neoplastiche inibendo la risposta immunitaria protettiva. [23]

## **PD-L1**

PD-L1 appartiene alla famiglia di proteine B7 ed è una glicoproteina transmembrana di tipo 1 da 33 kDa che contiene 290 aminoacidi con domini Ig- e IgC nella sua regione extracellulare; è una proteina ligando che inibisce la risposta immunitaria legandosi ai suoi due recettori: PD-1 e B7.1. Questo legame inibisce le cellule T attivate e riduce la risposta delle cellule T diminuendo l'attivazione mediata dal TCR e la co-stimolazione del CD28, con conseguente riduzione della proliferazione delle cellule immunitarie e della secrezione di citochine. PD-L1 è solitamente espresso da macrofagi, da alcune cellule T e B attivate, da cellule dendritiche e da alcune cellule epiteliali, in particolare in condizioni infiammatorie ed è associato ad un ambiente immunitario ricco di cellule T CD8+. Inoltre, PD-L1 è espresso dalle cellule tumorali come un "meccanismo immunitario adattativo" per sfuggire al sistema immunitario. Durante lo sviluppo di una neoplasia, gli antigeni tumorali creano un'iperattivazione delle cellule T di molteplici recettori inibitori, che porta ad un'alterazione nel processo di riconoscimento del tumore. Le cellule tumorali esprimono il recettore di morte programmata 1 (PD-L1) che si lega ai recettori PD-1 delle cellule T, con conseguente inibizione del sistema immunitario.

PD-L1 può essere espresso sia dalle cellule tumorali che dalle cellule immunitarie infiltranti il tumore, in diversi tipi di tumore solido, tra cui il melanoma, il carcinoma polmonare non a piccole cellule, il carcinoma ovarico, il carcinoma mammario. Nel tumore mammario, un'elevata espressione di PD-L1 è associata a una maggiore infiltrazione di TILs. [23]

## **Immunoterapia**

L'obiettivo dell'immunoterapia è quello di sfruttare e migliorare il sistema immunitario interrompendo la regolazione immunitaria negativa che consente agli antigeni tumorali di sfuggire al sistema immunitario. L'uso di anticorpi monoclonali anti-PD-L1 o anti-CTLA4, che sta alla base dell'immunoterapia, è finalizzato al blocco dei *checkpoint* immunitari con miglioramento della citotossicità e della capacità proliferativa dei linfociti intra-tumorali ed ha dimostrato una importante attività antitumorale, anche nel carcinoma della mammella triplo-negativo.

L'immunoterapia con anticorpi monoclonali anti-PD-L1, contribuisce ad aumentare l'immunità antitumorale o andando a legare il recettore PD-1 espresso dalle cellule T, che quindi non è più disponibile al legame con PD-L1 espresso dalle cellule tumorali, o legando direttamente PD-L1, bloccandolo.[24, 25]

L'immunoterapia ha profondamente cambiato lo standard di trattamento delle neoplasie e ha migliorato le aspettative di sopravvivenza dei pazienti.

Per quanto riguarda il carcinoma della mammella, al momento della stesura di questa Tesi, AIFA ha approvato l'utilizzo di un anticorpo monoclonale anti-PD-L1 detto Atezolizumab in combinazione con chemioterapia (Nab-Paclitaxel) nel trattamento del carcinoma mammario triplo-negativo non

resecabile, localmente avanzato o metastatico, in pazienti non precedentemente sottoposti a chemioterapia per malattia metastatica (prima linea). Per la somministrazione della terapia il carcinoma deve avere un'espressione di PD-L1  $\geq$  1% nelle cellule immunitarie infiltranti la neoplasia. [26]

Atezolizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato anti-PD-L1. Più precisamente è una IgG1 kappa-immunoglobulina non glicosilata con massa molecolare calcolata di 145 kDa, che si lega a PD-L1 e blocca l'interazione con PD-1 e B7. Induce così una riattivazione del sistema immunitario antitumorale senza citotossicità cellulare indotta dall'anticorpo.

Questa combinazione di farmaci chemioterapici e immunoterapici ha dimostrato di indurre la morte delle cellule immunogeniche tumorali, riducendo il carico tumorale e permettendo al farmaco immunoterapico di essere più efficace. L'aggiunta di Atezolizumab ha migliorato il tasso di risposta patologica completa e aumentato la sopravvivenza a 25 mesi, rispetto ai 15,5 delle donne trattate con placebo + Nab Paclitaxel. [27, 28]

L'approvazione è avvenuta sulla base dei dati dello studio di fase III IMpassion130 in pazienti con tumore mammario triplo-negativo. [29]

In base alle conclusioni di questo studio, per l'identificazione dei pazienti candidati a terapia con Atezolizumab+Nab-Paclitaxel, lo stato di PD-L1 deve essere studiato con valutazione immunoistochimica di PD-L1 sulle cellule infiammatorie infiltranti la neoplasia (IC) utilizzando il saggio immunoistochimico Ventana SP142.

In particolare, si deve valutare che percentuale dell'area tumorale totale è occupata da cellule immunitarie che infiltrano lo stroma tumorale - linfociti, cellule dendritiche, macrofagi e granulociti (IC) positive per PD-L1, non considerando eventuali aree di necrosi. [30]

### **Immunoistochimica**

L'immunoistochimica è una metodica che permette di visualizzare gli antigeni mediante l'applicazione sequenziale di un anticorpo primario all'antigene, di un anticorpo secondario (anticorpo ponte) all'anticorpo primario e di un complesso enzimatico e di un substrato cromogeno, con fasi di lavaggio intermedie. L'attivazione enzimatica del cromogeno genera un prodotto di reazione visibile in corrispondenza del sito dell'antigene. Al termine dell'incubazione dell'anticorpo lo strumento lava i vetrini per terminare la reazione e rimuovere il materiale che non si è legato. Il campione viene quindi controcolorato.

L'anticorpo funge da sonda, cioè opera come uno strumento capace di interagire con l'antigene da analizzare e di trasferire all'operatore le informazioni ricavate da questa interazione. Gli anticorpi sono proteine facilmente ottenibili, possono essere conservate per lungo tempo in soluzione, sono dotate di un'elevatissima specificità per il bersaglio, sono rilevabili a loro volta come antigeni per i quali possono essere costruiti dei sistemi di rivelazione eccezionalmente sensibili e diversificati. Gli

antigeni ricercati per scopi diagnostici sono eterogenei. Essi possono essere singole molecole (proteine, glicoproteine, polisaccaridi) o interi microrganismi (virus, batteri, funghi, protozoi). I processi di fissazione necessari per l'allestimento dei preparati istologici in paraffina alterano in vario modo la struttura degli antigeni, dalla completa perdita dei determinanti a modificazioni reversibili. Il recupero antigenico può essere effettuato mediante una lieve digestione enzimatica o con il riscaldamento della sezione istologica, immersa in soluzioni tamponate o in forno a microonde. Il tipo di trattamento, il pH e i tempi vanno determinati per ogni diverso antigene. Gli enzimi più utilizzati nelle colorazioni immunistochemiche sono la perossidasi e la fosfatasi alcalina.

## **SCOPO DELLA TESI**

Scopo di questa tesi è quello di descrivere la metodica immunohistochimica di allestimento e di valutazione di PD-L1 (SP142), analizzando la sua espressione in carcinomi mammari triplo-negativi (TNBC) sia primitivi che metastatici e di correlarlo con le caratteristiche del microambiente tumorale, in particolare con i linfociti infiltranti il tumore (TILs). A questo scopo, è stata rivalutata la casistica disponibile presso l'UOC di Anatomia Patologica dell'Ospedale "San Bortolo" di Vicenza.



## **MATERIALI E METODI**

Abbiamo rivalutato la casistica disponibile presso l'U.O.C. di Anatomia Patologica dell'Ospedale "San Bortolo" di Vicenza.

Lo studio dell'espressione di PD-L1 era stato effettuato su casi di carcinoma mammario triplo negativo in fase metastatica, in seguito a specifica richiesta da parte del Medico Oncologo. Il materiale istologico sul quale è stato testato l'anticorpo proveniva, a seconda del caso, dagli archivi dell'U.O.C. di Anatomia Patologica dell'Ospedale "San Bortolo" di Vicenza oppure da Istituzioni esterne.

In tutti i casi il materiale era stato fissato in formalina ed incluso in paraffina.

La casistica esaminata è relativa al periodo compreso tra marzo 2019 e aprile 2022.

PD-L1 era stato testato o sulla neoplasia primitiva o sulla metastasi o, in alcuni casi, su entrambe. A seconda del tipo di materiale disponibile, il test era stato eseguito su materiale da agobiopsia o da campione operatorio.

### **Valutazione di PD-L1 nel carcinoma mammario triplo negativo – reazione immunoistochimica con test Ventana PD-L1 (SP142)**

Il test Ventana PD-L1 (SP142) è un saggio immunoistochimico che utilizza un anticorpo primario di coniglio anti-PD-L1 per riconoscere la proteina PD-L1 e che permette la rilevazione colorimetrica delle cellule immunitarie infiltranti il tumore.

## **STRUMENTI**

- Microtomo Bio-Optical Micron HM 350 S
- Stendifettine contenente acqua corrente a 37 °C;
- Stufa a 60° C
- Coloratore automatico Benchmark ultra Ventana

## **Materiali**

- ANTI-PDL1 Rabbit Monoclonal Primary Antibody
- Tessuti benigni di tonsilla umana da utilizzare come tessuti di controllo
- Rabbit Monoclonal Negative Control Ig
- OptiView DAB IHC Detection Kit
- OptiView Amplification Kit
- EZ Prep™ Ventana: soluzione sparaffinatrice a base acquosa (10X)
- Reaction Buffer Concentrate (10X)

- LCS (Predilute) per strumenti BenchMark XT e GX
- ULTRA LCS (Predilute) per lo strumento BenchMark ULTRA
- SSC Ventana: soluzione di stringenza (5X)
- Cell Conditioning Solution (CC1) per strumenti BenchMark XT e GX: soluzione per lo smascheramento antigenico
- ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) per lo strumento BenchMark ULTRA
- Hematoxylin II controcolorante
- Bluing Reagent
- montante permanente
- coprioggetto
- montavetrini automatico
- microscopio ottico
- garze assorbenti

## METODICA

### **Preparazione del campione**

I tessuti devono essere fissati con formalina e inclusi in paraffina. Per un'ottimale fissazione si utilizza la formalina neutra tamponata al 10% per un minimo di 6 ore e un massimo di 72 ore, in quanto un tempo inferiore alle 6 ore.

Ogni sezione deve essere tagliata allo spessore appropriato (2-5  $\mu\text{m}$ ) per l'anticorpo primario utilizzato e collocata su un vetrino per microscopio caricato positivamente. Prima del riscaldamento, i vetrini contenenti la sezione di tessuto si devono asciugare in posizione verticale per almeno 15 minuti a temperatura ambiente per drenare l'eccesso di acqua presente sotto la sezione. I vetrini devono quindi essere riscaldati in un forno per 1 ora a  $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  oppure asciugati all'aria a  $37^{\circ}\text{C}$  per un massimo di 24 ore. L'asciugatura e il riscaldamento dei vetrini sono impiegati per asciugare il tessuto dopo il montaggio sul vetrino e per migliorare l'adesione del tessuto al vetrino, con la consapevolezza, però, che il riscaldamento prolungato del tessuto può determinare una riduzione della disponibilità dell'antigene.

### **Processazione in BenchMark ULTRA IHC/ISH**

- 1 Riscaldare i vetrini a  $72^{\circ}\text{C}$
- 2 Incubare per 4 minuti
- 3 Aggiustare il volume di EZ Prep
- 4 Risciacquare il vetrino con EZ Prep
- 5 Aggiustare il volume di EZ Prep

(Queste fasi corrispondono alla sparaffinatura)

6 Disattivare il riscaldamento dei vetrini

7 Dispensare Cell Conditioner Solution 1

(Cell Conditioning Solution 1 è una soluzione diluita usata nella fase di pretrattamento della processazione dei campioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina per le applicazioni di immunohistochimica.

La fissazione di tessuto mediante formalina determina la formazione di legami covalenti tra l'aldeide e i gruppi amminici presenti nel tessuto. La formazione di questi legami denatura la proteina, causando il mascheramento degli epitopi, modificandone la loro struttura e accessibilità. La formalina impedisce così il riconoscimento del sito antigenico da parte dell'anticorpo primario. La formaldeide inoltre può formare ponti metilenici che creano legami crociati tra le proteine del tessuto, riducendo quindi la permeabilità del tessuto a molecole di grandi dimensioni come gli anticorpi. Ciò comporta la perdita dell'immunoreattività. CC1 è un tampone a pH 9 che a temperature elevate idrolizza i legami covalenti creati dalla formalina nel tessuto. La rimozione di questi legami permette la rinaturazione delle proteine e aumenta l'accessibilità degli anticorpi, permettendo il riconoscimento dell'epitopo. La soluzione CC1 è utilizzata con anticorpi primari per il recupero antigenico).

8 Riscaldare i vetrini a 100°C, e incubare per 4 minuti

9 Incubare per 12 minuti

10 Incubare per 16 minuti

11 Incubare per 8 minuti

(Per un totale di 40 minuti a 100 gradi; serve per lo smascheramento. Lo smascheramento deve essere svolto prima dell'incubazione con l'anticorpo primario.

12 Disattivare il riscaldamento dei vetrini

13 Risciacquare il vetrino con Reaction Buffer

14 Aggiustare il volume sul vetrino con Reaction Buffer

15 Riscaldare i vetrini a 36 °C

16 Risciacquare il vetrino con Reaction Buffer

17 Aggiustare il volume sul vetrino con Reaction Buffer

18 Dispensare una aliquota di OV PEROX IHBTR (OPTIVIEW PEROXIDASE INHIBITOR), aggiungere Coverslip e incubare per 4 minuti.

(Passaggio per inibizione perossidasi endogena. Gli enzimi endogeni presenti nel tessuto si modificano in modo variabile con la fissazione e l'inclusione; alcuni persistono immutati, come

la perossidasi endogena. La perossidasi endogena risulta particolarmente presente nelle cellule del sangue, fegato, milza, utero, ghiandole lacrimali, mucosa intestinale e polmone.

Optiview Peroxidase Inhibitor contiene il 3% di soluzione di perossido di idrogeno. Blocca la perossidasi endogena attiva, che potrebbe determinare una colorazione di fondo aspecifica).

19 Dispensare Coverslip, aggiungere una aliquota di PD-L1 (SP142), e incubare per 16 minuti (Incubazione anticorpo primario)

20 Due lavaggi in reaction buffer

21 Dispensare Coverslip, aggiungere una aliquota di OV HQ UNIV LINKR (anticorpo secondario), e incubare per 8 minuti .

(Optiview HQ universal linker contiene una miscela di anticorpi (IgG anti-topo di capra, IgM anti-topo di capra e anti-coniglio di capra) marcati con HQ (l'HQ è un aptene legato in modo covalente agli anticorpi di capra) in un tampone contenente proteine con lo 0.05% di Proclin 300, un conservante).

22 Due lavaggi in reaction buffer

23 Dispensare Coverslip, aggiungere una aliquota di OV HRP MULTIMER, e incubare per 8 minuti. (Optiview HRP multimer contiene un anticorpo terziario monoclonale di topo anti-HQ coniugato ad HRP in un tampone contenente proteine con lo 0.05% di Proclin 300, un conservante).

24 Un lavaggio con Reaction Buffer

25 Dispensare una aliquota di OV AMP H2O2 e una aliquota di OV AMPLIFIER, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti. OV AMP H2O2 contiene lo 0.04% di perossido di idrogeno, (OV AMPLIFIER contiene tirammide con un linker contenente HQ in un diluente con conservante).

26 Due lavaggi con Reaction Buffer

27 Dispensare una aliquota di OV AMP MULTIMER, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti. (OV AMP MULTIMER contiene un anticorpo monoclonale di topo anti-HQ coniugato ad HRP, in un diluente con lo 0.05% di Proclin 300).

28 Due lavaggi con reaction buffer

(OV AMPLIFIER, OV AMP H2O2 e OV AMP MULTIMER sono contenuti nell'OptiView Amplification Kit, progettato per generare un aumento del segnale degli anticorpi primari colorati con Optiview DAB ICH Detection Kit su strumenti Benchmark ICH. Gli anticorpi specifici legati agli antigeni nel tessuto vengono visualizzati tramite un precipitato di colore marrone).

29 Dispensare una aliquota di OV H2O2 e una aliquota di OV DAB, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti.

(OV H2O2 contiene lo 0.04% di perossido di idrogeno in una soluzione tampone fosfato. OV DAB contiene lo 0.2% p/v di 3,3' diamminobenzidina tetraidrocloruro (CROMOGENO) in una soluzione stabilizzante con conservante).

30 Un lavaggio con Reaction Buffer

31 Dispensare una aliquota di OV COPPER, aggiungere Coverslip e incubare per 4 minuti. (OV COPPER contiene solfato di rame in un tampone acetato con un conservante; amplifica ulteriormente la reazione (annerisce)).

32 Un lavaggio con Reaction Buffer

34 Dispensare una aliquota di HEMATOXYLIN II, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti. (Hematoxylin II è un'ematossilina di Mayer modificata che colora i nuclei cellulari. In immunohistochimica è indicata per la controcolorazione). Essa colora i nuclei in blu mediante legame tra un complesso mordente-colorante e gli acidi nucleici e le proteine istoniche dell'eterocromatina).

35 Un lavaggio con Reaction Buffer

36 Dispensare una aliquota di BLUING REAGENT, aggiungere Coverslip e incubare per [4 minuti]. (Bluing Reagent è una soluzione acquosa di carbonato di litio tamponato. Serve per rendere la tonalità della controcolorazione con ematossilina di colore blu più intenso, quindi per ottenere un'adeguata controcolorazione. Agisce mediante l'effetto combinato degli ioni di litio e l'aumento del pH del tampone di lavaggio).

37 Un lavaggio con Reaction Buffer (per rimuovere il materiale non legato)

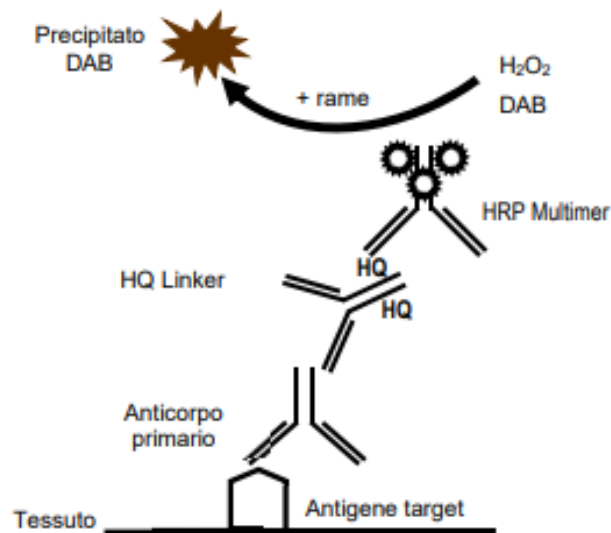
38 Disattivare il riscaldamento dei vetrini

39 Risciacquare il vetrino con Reaction Buffer

## **OPTIVIEW DAB ICH DETECTION KIT**

OptiView DAB IHC Detection Kit è un sistema indiretto privo di biotina che rileva anticorpi primari specifici IgG/IgM di topo e di coniglio legati a un antigene in sezioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE) o in sezioni di tessuto congelato, colorate sui coloratori per istologia automatizzati VENTANA e visualizzabili mediante un microscopio ottico. Essendo indiretto, impiega un anticorpo terziario (HRP MULTIMER) marcato con un enzima che si lega all'anticorpo secondario (HQ UNIVERSAL LINKER) diretto contro la specie dell'anticorpo primario. Importante è la presenza del complesso substrato-cromogeno per la visualizzazione dell'enzima con cui l'anticorpo terziario è marcato. Il substrato è rappresentato dal perossido di idrogeno, mentre il cromogeno consiste nella 3,3'-diamminobenzidina tetraidrocloruro (DAB). Questa combinazione dà come risultato un precipitato enzimatico di colore marrone presso il sito di legame dell'anticorpo primario con l'antigene.

Il protocollo di colorazione è articolato in varie fasi nelle quali i reagenti vengono incubati per periodi pre-determinati a temperature specifiche. Al termine di ogni fase di incubazione, lo strumento BenchMark IHC/ISH lava le sezioni per rimuovere il materiale non legato e applica un coverslip (LCS), liquido che minimizza l'evaporazione dei reagenti acquosi dal vetrino.



**Figura 1**

### **OPTIVIEW AMPLIFICATION KIT**

OV AMPLIFIER, OV AMP H2O2 e OV AMP MULTIMER sono contenuti nell'OptiView Amplification Kit, progettato per generare un aumento del segnale degli anticorpi primari colorati con Optiview DAB ICH Detection Kit. Gli anticorpi specifici legati agli antigeni nel tessuto vengono visualizzati tramite un precipitato di colore marrone.

### **Controllo di qualità**

Per ogni ciclo di colorazione occorre sempre allestire anche un controllo positivo utilizzando tessuto da tonsilla umana. Il controllo positivo può consentire di controllare tutte le fasi dell'analisi, dalla preparazione del tessuto fino alla colorazione.

Le cellule benigne di tonsilla umana sono un controllo tissutale ideale in quanto la tonsilla contiene elementi di colorazione sia positivi che negativi e può servire come controllo tissutale positivo e negativo per il saggio Ventana PD-L1 (SP142). Il parenchima tonsillare contiene fisiologicamente cellule immunitarie da moderatamente a fortemente PD-L1-positivo (linfociti e monociti) disperse nella regione paracorticale, o in gruppi all'interno dei centri germinativi e cellule epiteliali fortemente positive delle cripte tonsillari (che fungeranno quindi da controllo positivo), ma l'epitelio

superficiale non mostra alcuna espressione di PD-L1 (controllo negativo). Pertanto, il tessuto tonsillare può essere utilizzato come controllo della colorazione sia delle cellule epiteliali che delle cellule immunitarie. Se, ad esempio, l'epitelio della cripta è positivo ma le cellule immunitarie non mostrano alcuna positività per PD-L1, la procedura di colorazione deve essere ripetuta.

## **INTERPRETAZIONE**

Dopo aver esaminato i tessuti di controllo, il Patologo esamina il tumore su un corrispondente vetrino colorato con Ematossilina&Eosina (EE), il vetrino colorato per PD-L1 viene valutato in modo semiquantitativo, indicando che percentuale dell'intera area tumorale totale è occupata da cellule immunitarie che infiltrano lo stroma tumorale - linfociti, cellule dendritiche, macrofagi e granulociti (IC) - positive per PD-L1, non considerando eventuali aree di necrosi (Fig. 2).

Le cellule immunitarie mostrano una colorazione marrone scuro pulverulenta e possono risultare colorate a gruppi o singolarmente disperse (Fig. 3); nella valutazione non si deve tenere conto dell'eventuale positività delle cellule tumorali che possono presentare una colorazione della membrana da moderata a forte, parziale o completa (Fig. 4).

Il tessuto neoplastico è considerato adeguato per la valutazione di PD-L1 (SP142) se contiene almeno 50 cellule tumorali vitali con stroma associato.

Il cut off per considerare un caso di carcinoma mammario PD-L1 (SP142) positivo è l'1% (positivi sono i casi con  $IC \geq 1\%$ ).

Oltre allo stato di PD-L1, per ogni caso sono state rivalutate anche le colorazioni immunoistochimiche per i fattori prognostico-predittivi (Ki67, ER, PR, HER2) ed abbiamo studiato quale fosse lo stato degli altri fattori prognostici della neoplasia (istotipo, grado, TILs).



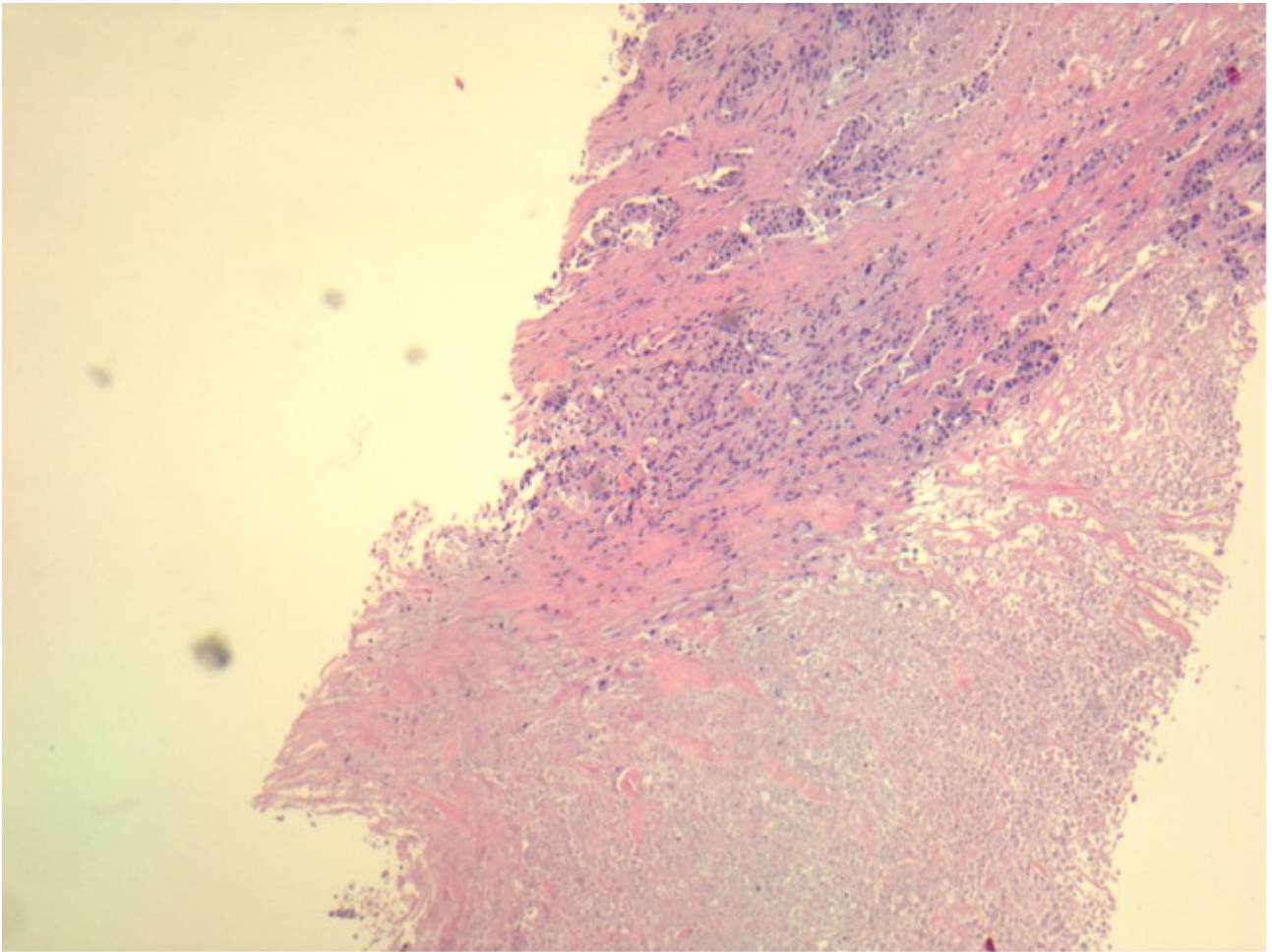


Figura 2: agobiopsia di carcinoma primitivo della mammella. La porzione superiore comprende cellule neoplastiche vitali; la porzione inferiore comprende area di necrosi (da non valutare come area tumorale) (EE; 5x)



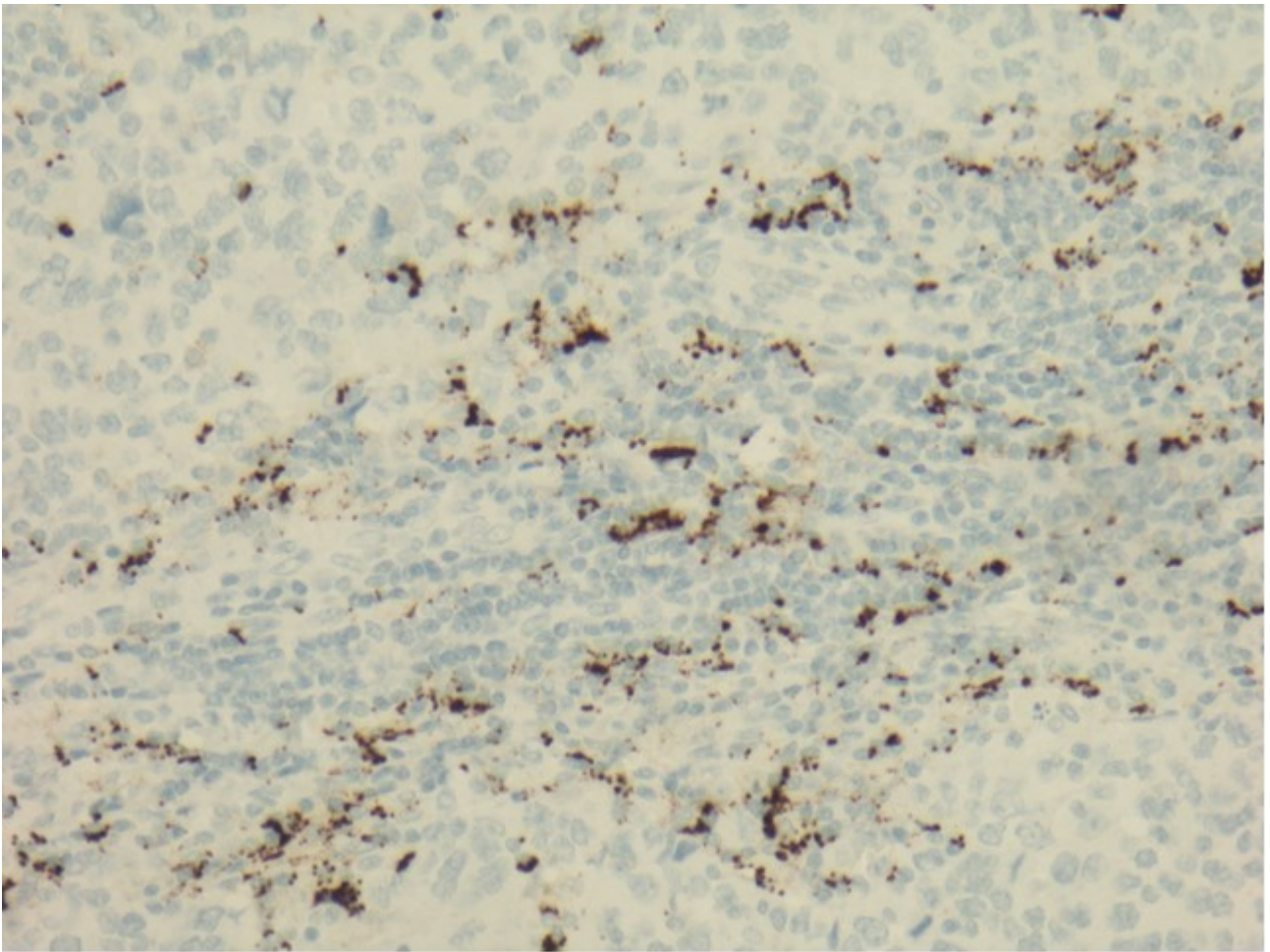


Figura 3: colorazione immunoistochimica per PD-L1 (SP142) nelle cellule immunitarie (PD-L1 SP142; 20x)

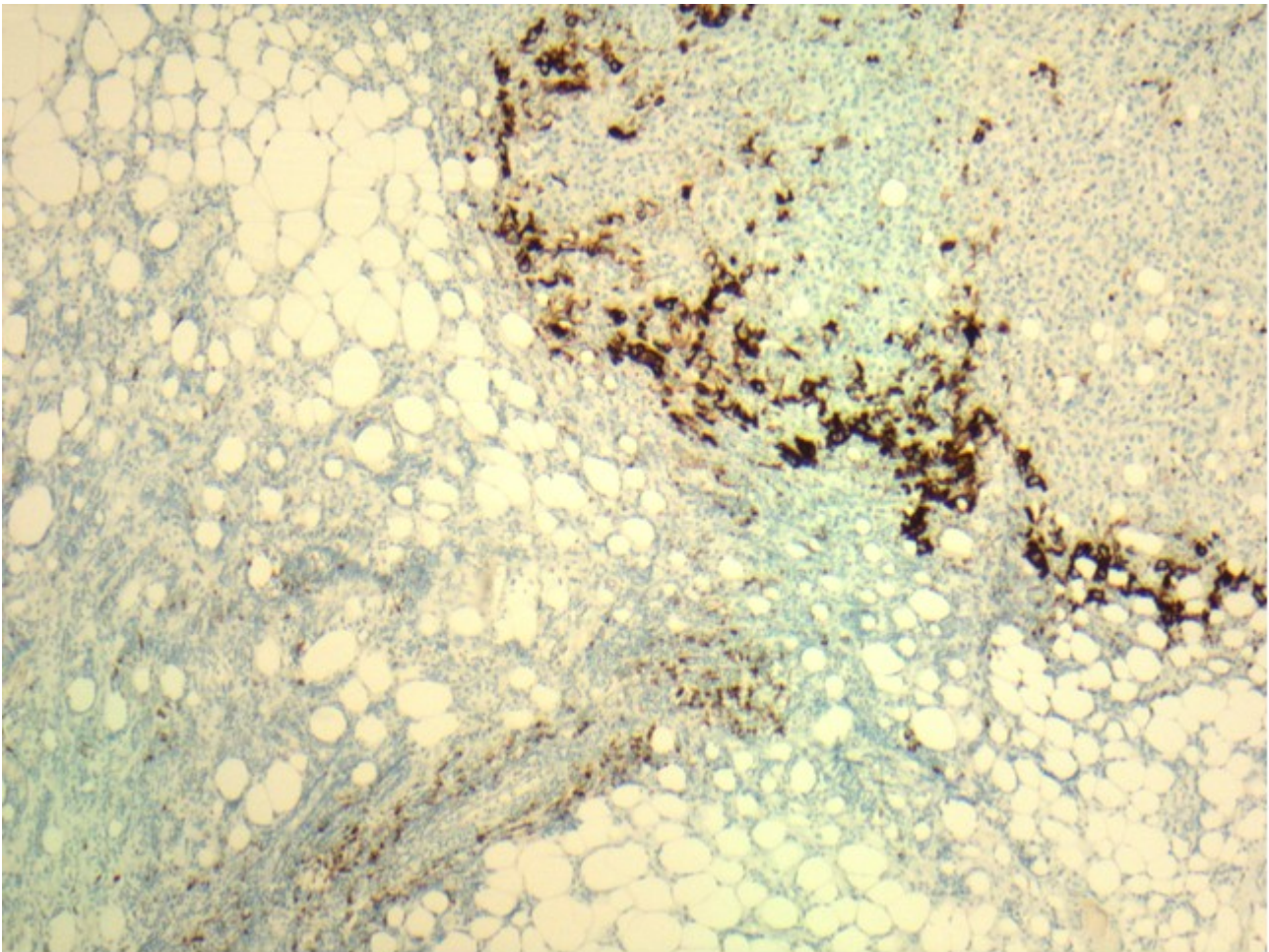


Figura 4: colorazione immunoistochimica per PD-L1 (SP142) nelle cellule immunitarie (parte sinistra della foto) e nelle cellule tumorali (parte destra della foto); nell'inserto: particolare di colorazione delle cellule tumorali (PD-L1 SP142; 5x e 20x)

### **Valutazione dei TILs**

I TILs sono valutati come percentuale di area di stroma intratumorale occupata da cellule infiammatorie mononucleate, inclusi linfociti e plasmacellule, ma escludendo i granulociti (Fig. 5).

[11]



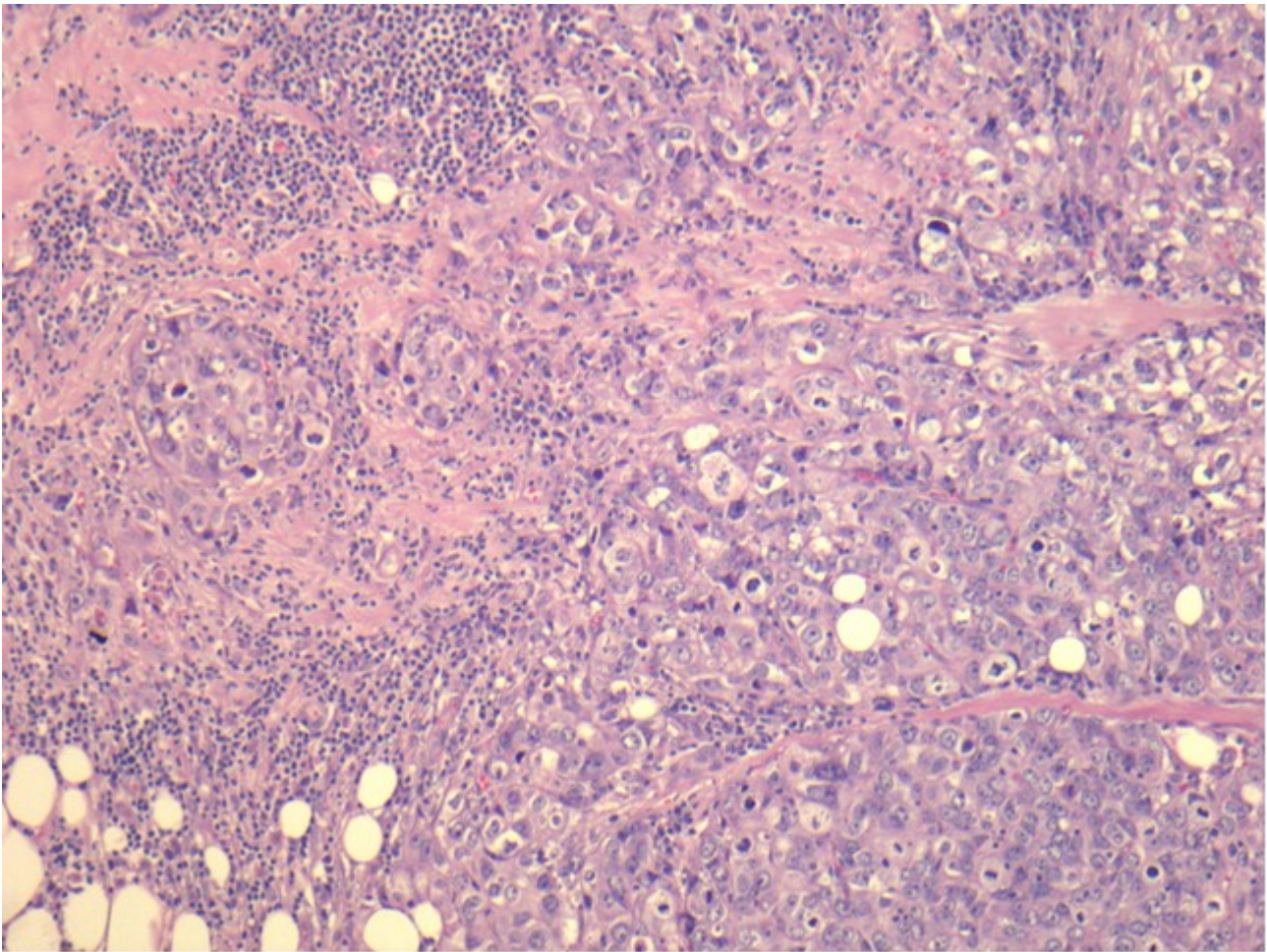


Figura 5: neoplasia mammaria primitiva: i TILs sono valutati come percentuale di area di stroma intratumorale occupata da cellule infiammatorie mononucleate, inclusi linfociti e plasmacellule, ma escludendo i granulociti (EE; 10x)

### **Valutazione dell'indice di proliferazione – Reazione immunoistochimica per Ki67**

La determinazione dell'indice proliferativo di una neoplasia viene effettuata tramite una valutazione quantitativa dell'espressione dell'antigene nucleare Ki67. Tale antigene è associato alla proliferazione cellulare e reperibile attraverso le varie fasi del ciclo cellulare (G1,S,G2,M) ma assente nelle cellule quiescenti. Per analizzare il grado di espressione di Ki67 si utilizza una colorazione immunoistochimica in cui viene usato un anticorpo primario monoclonale di coniglio specifico per Ki67 (CONFIRM™ ANTI-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody) e un sistema di visualizzazione coniugato ad un anticorpo secondario anti-immunoglobuline di coniglio. Infine si utilizza una soluzione di sviluppo contenente diaminobenzidina (DAB).

## Reazione immunoistochimica per Ki67

### MATERIALI

- EZ Prep™ Ventana: soluzione sparaffinatrice a base acquosa (10X)
- SSC Ventana: soluzione di stringenza (5X)
- Reaction Buffer Ventana (10X): buffer di reazione
- Cell Conditioning 1 Ventana: soluzione per lo smascheramento antigenico a pH 8
- CONFIRM™ ANTI-Ki67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody
- Hematoxylin II Counterstain Ventana

### METODICA

- 1) sparaffinatura
- 2) cell conditioning
- 3) cell conditioner 1 a pH 8
- 4) CC1 ridotto per 30 minuti
- 5) incubazione anticorpo a 37°C
- 6) dispensazione dell'anticorpo e incubazione per 16 minuti
- 7) ultraWash
- 8) dispensazione di kit di rilevazione Ultraview Universal DAB
- 9) controcolorazione con Ematossilina
- 10) aggiunta di coverslip e incubazione per 4 minuti

### INTERPRETAZIONE

L'interpretazione dei risultati viene effettuata indicando la percentuale di cellule neoplastiche positive (con nucleo colorato) rispetto alla totalità delle cellule tumorali.

### **Valutazione dei recettori per gli estrogeni (ER)– Reazione immunoistochimica per ER**

La presenza di ER nelle cellule neoplastiche viene valutata con un test immunoistochimico che utilizza un anticorpo primario monoclonale di coniglio specifico per la porzione c-terminale del recettore  $\alpha$  per gli estrogeni (CONFIRM™ anti-estrogen receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody) e un sistema di visualizzazione coniugato ad un anticorpo secondario anti-immunoglobulina di coniglio. Infine si utilizza una soluzione di sviluppo contenente diaminobenzidina (DAB).

## Reazione immunoistochimica per ER

### MATERIALI

- EZ Prep™ Ventana: soluzione sparaffinatrice a base acquosa (10X)
- SSC Ventana: soluzione di stringenza (5X)
- Reaction Buffer Ventana (10X): buffer di reazione

- Cell Conditioning 1 Ventana: soluzione per lo smascheramento antigenico a pH 8
- CONFIRM™ anti-estrogen receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody
- Hematoxylin II Counterstain Ventana

#### METODICA

- 1) sparaffinatura
- 2) cell conditioning
- 3) cell conditioner 1 a pH 8
- 4) CC1 ridotto per 30 minuti
- 5) incubazione anticorpo a 37°C
- 6) dispensazione dell'anticorpo e incubazione per 20 minuti
- 7) ultraWash
- 8) dispensazione di kit di rilevazione Ultraview Universal DAB
- 9) controcolorazione con Ematossilina
- 10) aggiunta di coverslip e incubazione per 4 minuti

#### INTERPRETAZIONE

L'interpretazione dei risultati viene effettuata indicando la percentuale di cellule neoplastiche positive (con nucleo colorato) rispetto alla totalità delle cellule tumorali.

#### **Valutazione dei recettori per il progesterone (PR)– Reazione immunoistochimica per PR**

La presenza di PR nel tessuto neoplastico viene valutata con un test immunoistochimico che utilizza un anticorpo primario monoclonale di coniglio specifico per il recettore per il progesterone (CONFIRM™ anti-progesteron receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody)) e un sistema di visualizzazione coniugato ad un anticorpo secondario anti-immunoglobulina di coniglio. Infine si utilizza una soluzione di sviluppo contenente diaminobenzidina (DAB).

#### Reazione immunoistochimica per PR

#### MATERIALI

- EZ Prep™ Ventana: soluzione sparaffinatrice a base acquosa (10X)
- SSC Ventana: soluzione di stringenza (5X)
- Reaction Buffer Ventana (10X): buffer di reazione
- Cell Conditioning 1 Ventana: soluzione per lo smascheramento antigenico a pH 8
- CONFIRM™ anti-progesteron receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody
- Hematoxylin II Counterstain Ventana

#### METODICA

- 1) sparaffinatura

- 2) cell conditioning
- 3) cell conditioner 1 a pH 8
- 4) CC1 ridotto per 30 minuti
- 5) incubazione anticorpo a 37°C
- 6) dispensazione dell'anticorpo e incubazione per 16 minuti
- 7) ultraWash
- 8) dispensazione di kit di rilevazione Ultraview Universal DAB
- 9) controcolorazione con Ematossilina
- 10) aggiunta di coverslip e incubazione per 4 minuti

#### INTERPRETAZIONE

Anche in questo caso l'interpretazione dei risultati viene effettuata indicando la percentuale di cellule neoplastiche positive (con nucleo colorato) rispetto alla totalità delle cellule tumorali.

## RISULTATI

Nel nostro lavoro sono stati analizzati 43 casi di carcinoma della mammella, relativi a 41 pazienti, tutte di sesso femminile (due pazienti erano affette da carcinoma della mammella bilaterale e PD-L1 è stato studiato su entrambi i focolai neoplastici).

In 33 casi il materiale proveniva dalla nostra AULSS, mentre in 10 casi il materiale ci era stato inviato da Istituzioni esterne.

L'età media delle pazienti era di 60 anni (range: 33-87); nei casi dov'è stata studiata la neoplasia primitiva l'età media era di 62 anni (range 33-87) (Tab. II); nei casi dov'è stata studiata solo la neoplasia metastatica l'età media era di 56 anni (range 40-77) (Tab. III).

In 29/43 casi (67%) lo studio di PD-L1 è stato effettuato solo su materiale da neoplasia primitiva (27 casi di carcinoma infiltrante NST, 1 caso di carcinoma infiltrante di tipo lobulare ed 1 caso di carcinoma infiltrante di tipo metaplastico); tra questi in 24/29 casi (83%) si trattava di materiale agobiottico, mentre in 5/29 casi (17%) si trattava di materiale da campione operatorio.

In 5/43 casi (12%) PD-L1 è stato studiato sia sulla neoplasia primitiva che sulla neoplasia metastatica, in particolare 2 casi di carcinoma infiltrante NST e la relativa metastasi epatica e 3 casi di carcinoma infiltrante NST e la relativa metastasi linfonodale.

In 9/43 casi (21%) PD-L1 è stato studiato solo su materiale da neoplasia metastatica (5 metastasi linfonodali di carcinoma infiltrante NST – Fig. 6, 1 metastasi linfonodale di carcinoma infiltrante di tipo lobulare, 2 metastasi epatiche di carcinoma infiltrante NST – Fig. 7 ed 1 metastasi polmonare di carcinoma infiltrante NST – Fig. 8) (Tab. III).

Si trattava in 2/43 casi (5%) di una neoplasia ben differenziata (G1), in 5/43 casi (11%) di una neoplasia moderatamente differenziata (G2) ed in 36/43 casi (84%) di neoplasia scarsamente differenziate (G3) (Tab. II, Tab. III).

Si trattava in tutti casi di neoplasie triplo-negative, tranne in 5 casi che avevano o una bassa espressione di ER (<10%) - c.d. casi ER low oppure una debole, focale espressione aberrante di PR con ER negativi. [9, 31, 32]



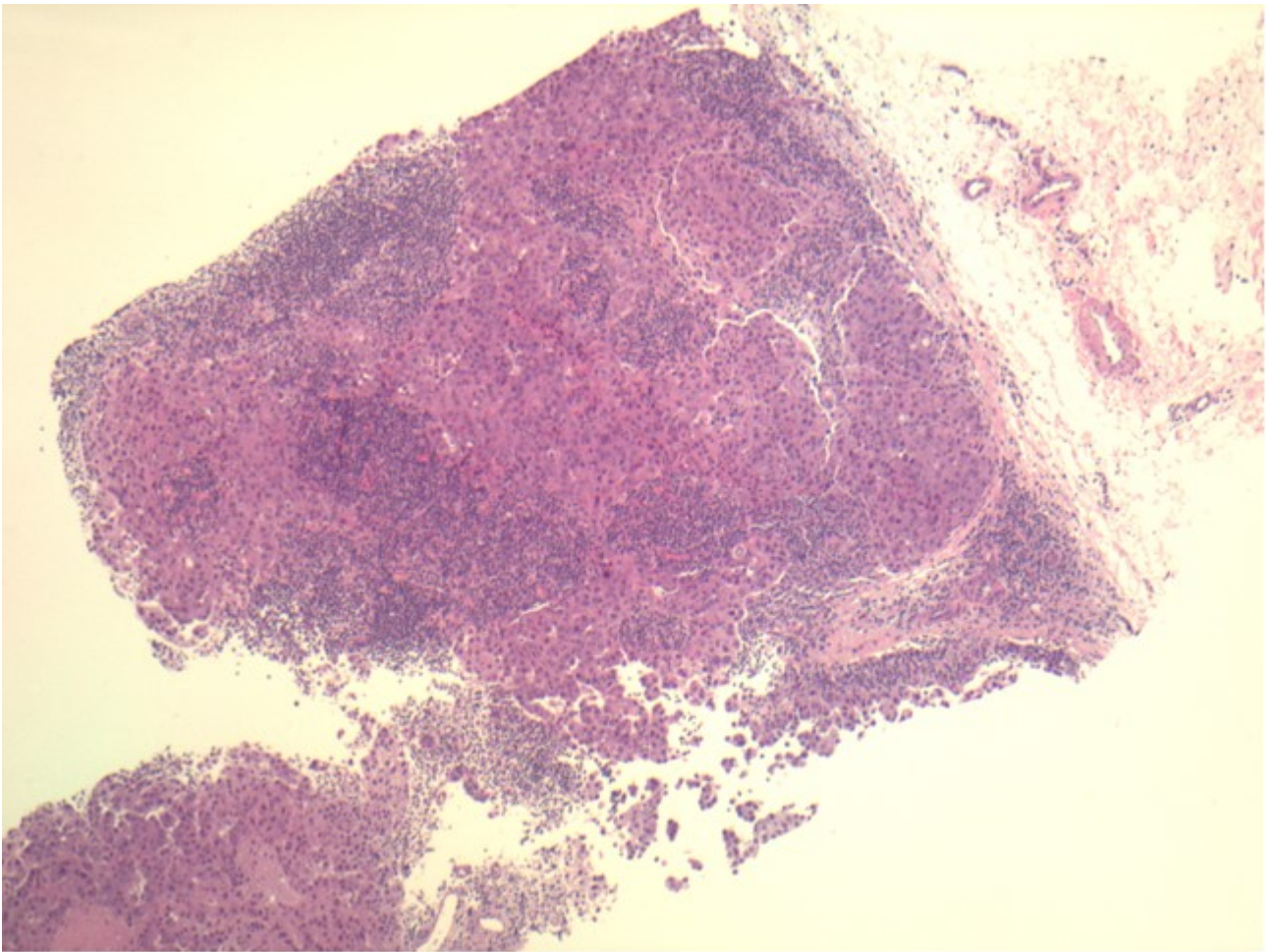


Figura 6: metastasi linfonodale di carcinoma della mammella (EE; 5x)



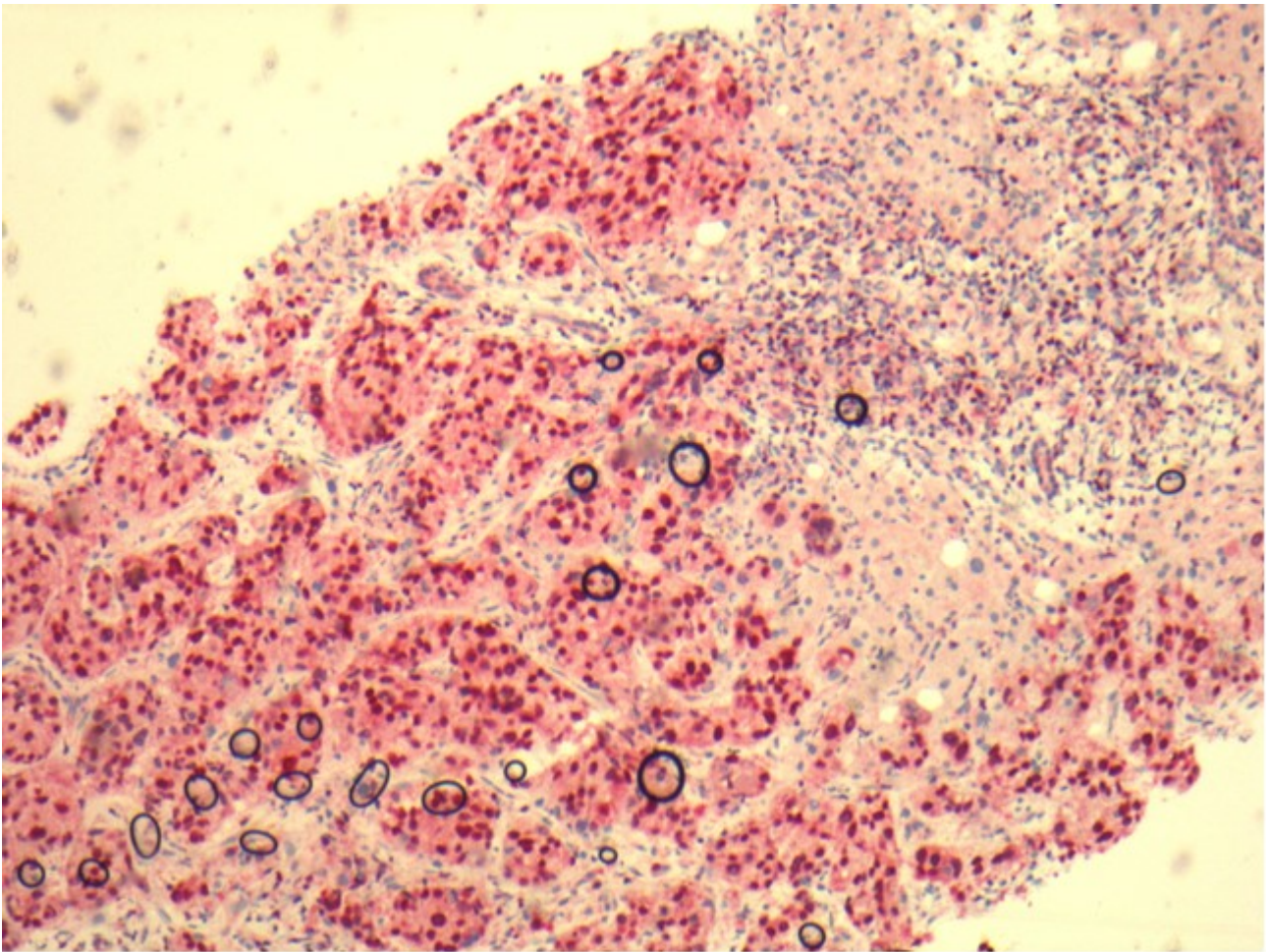


Figura 7: agobiopsia di metastasi epatica di carcinoma della mammella (GATA3; 10x)

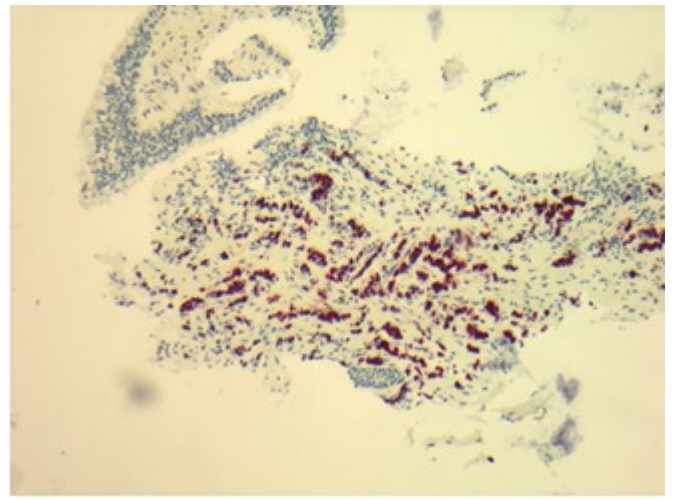
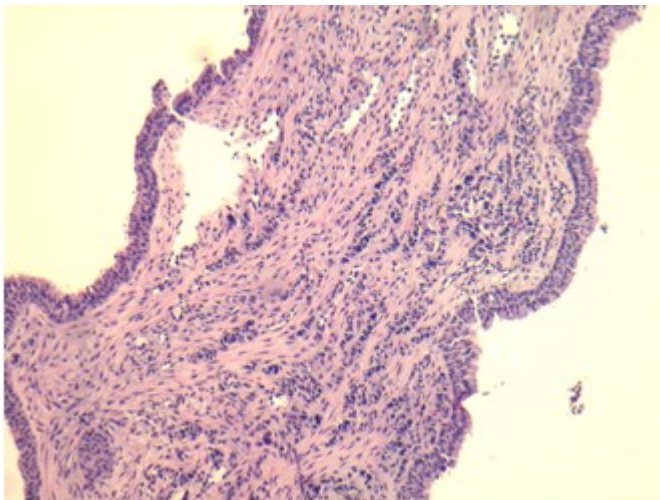


Figura 8: biopsia bronchiale con metastasi di carcinoma della mammella (sinistra: EE; destra: GATA3; 10x)

L'indice proliferativo (misurato tramite colorazione immunohistochimica per Ki67) è risultato in media del 44% (range 15%-70%) (Tab. II). Nei casi dov'è stata studiata la neoplasia primitiva



l'indice proliferativo medio era del 44% (range 15%-70%) (Tab. IV); nei casi dov'è stata studiata solo la neoplasia metastatica l'indice proliferativo medio era del 39% (range 15%-60%) (Tab. III). Nella casistica generale (n. 43 casi) TIL è risultato <10% in 15/42 casi (36%), compreso tra 10% e 40% in 22/42 casi (52%) e >40% in 5/42 casi (12%); in 1 caso il TIL non è risultato valutabile (Tab. IV).

Nei casi primitivi il TIL è risultato <10% in 12/34 casi (35%), compreso tra 10% e 40% in 19/34 casi (56%) e >40% in 3/34 casi (9%) (Fig. 9) (Tab. II).

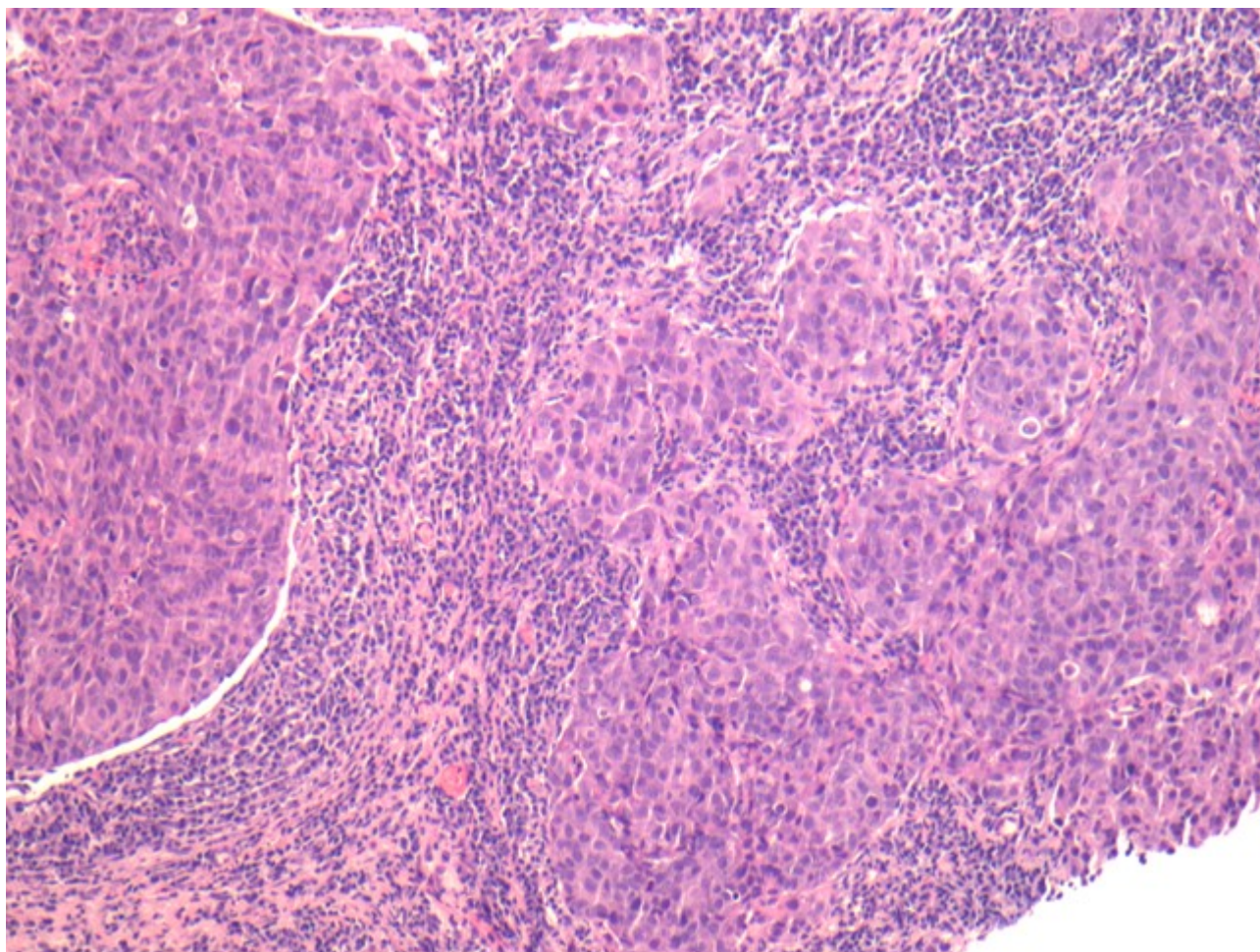


Figura 9: carcinoma della mammella con TILs>40% (EE; 10x)

Nelle metastasi linfonodali il TIL è risultato <10% in 1/9 casi (11%), compreso tra 10% e 40% in 6/9 casi (67%) e >40% in 2/9 casi (22%).

Nelle metastasi epatiche il TIL è risultato <10% in 3/4 casi (75%) e compreso tra 10% e 40% in 1/4 casi (25%); in nessun caso il TIL della metastasi epatica è risultato >40%.

Nella metastasi polmonare il TIL non è risultato valutabile per le caratteristiche del materiale.

Nella casistica generale (n. 43 casi), PD-L1 è risultato negativo (<1%) in 12/43 casi (28%) e positivo ( $\geq 1\%$ ) in 31/43 casi (72%) (Tab. IV); in particolare, tra i casi positivi, PD-L1 era compreso tra 1% e 10% in 26/31 casi (84%) e  $>10\%$  in 5/31 casi (16%).

Nelle neoplasie primitive (n. 34 casi), PD-L1 è risultato negativo (<1%) in 9/34 casi (26%) e positivo ( $\geq 1\%$ ) in 25/34 casi (74%) (Tab. II); in particolare, tra i casi positivi, PD-L1 era compreso tra 1% e 10% in 21/25 casi (84%) e  $>10\%$  in 4/25 casi (16%).

Nei casi dove PD-L1 è stato studiato solo su neoplasia metastatica (n. 9 casi), in 3/9 casi (33%) PD-L1 è risultato negativo (<1%) (2 metastasi linfonodali e la metastasi polmonare), in 6/9 casi (67%) è risultato positivo ( $\geq 1\%$ ) (4 metastasi linfonodali – Fig. 10 - e 2 metastasi epatiche – Fig. 11) (Tab. III); in particolare, tra i casi positivi, PD-L1 era compreso tra 1% e 10% in 5/6 casi (83%) e  $>10\%$  in 1/6 casi (17%); in quest'ultimo caso si trattava di una metastasi linfonodale.

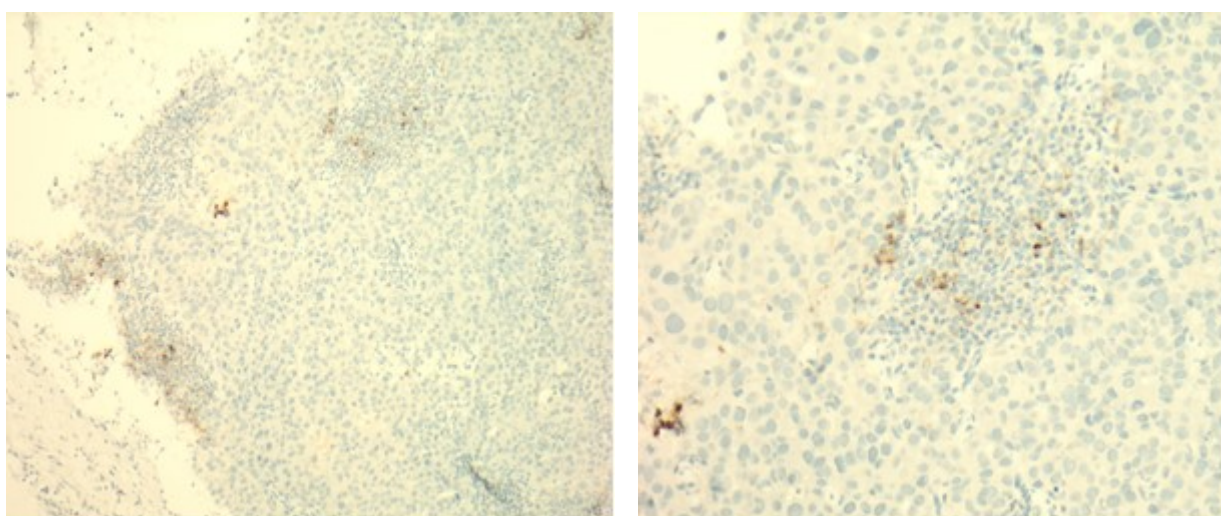


Figura 10: metastasi linfonodale con PD-L1 (SP142) positivo ( $\geq 1\%$ ) (PD-L1 SP142; 10x e 20x)



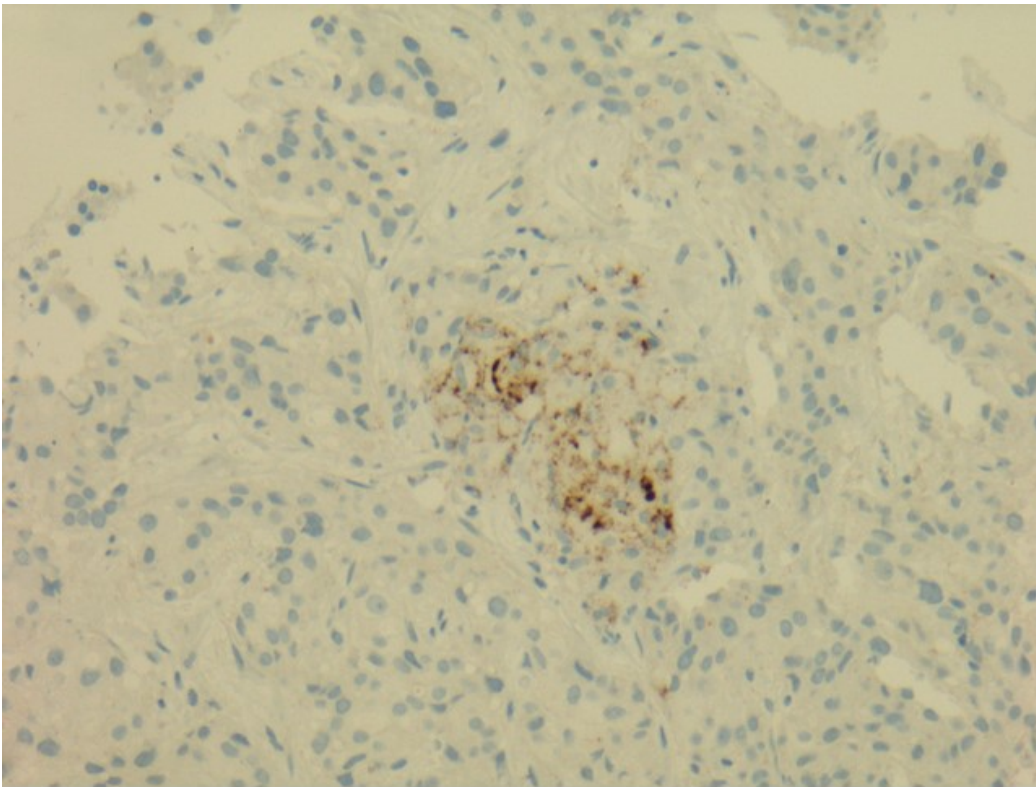


Figura 11: metastasi epatica con PD-L1 (SP142) positivo ( $\geq 1\%$ ) (PD-L1 SP142; 20x)

Nei casi dov'era disponibile sia materiale da neoplasia primitiva che materiale da metastasi (n. 5 casi) confrontando l'espressione di PD-L1 in carcinoma primitivo e metastatico:

- nei 2 casi con neoplasia primitiva e metastasi epatica: in 1/2 casi (50%) PD-L1 era negativo ( $< 1\%$ ) in entrambe le sedi; in 1/2 casi (50%) PD-L1 era positivo ( $\geq 1\%$ , compreso tra 1% e 10%) nella neoplasia primitiva e negativo nella metastasi;
- nei 3 casi con neoplasia primitiva e metastasi linfonodale: in tutti e tre i casi (3/3 – 100%) PD-L1 era positivo ( $\geq 1\%$ , compreso tra 1% e 10%) sia nella neoplasia primitiva che nella metastasi.

In generale, nei casi dove PD-L1 è stato studiato su materiale metastatico (esclusivamente su quello o anche su neoplasia primitiva) (n. 14 casi): PD-L1 è risultato negativo ( $< 1\%$ ) in 5/14 casi (36%) e positivo ( $\geq 1\%$ ) in 9/14 casi (64%) (Tab. V); in particolare, tra i casi positivi, PD-L1 era compreso tra 1% e 10% in 8/9 casi (89%) e  $> 10\%$  in 1/9 casi (11%).

Suddividendo i risultati per sede di metastasi, tra i 9 casi di metastasi linfonodale, essa è risultata PD-L1 negativa ( $< 1\%$ ) in 2/9 casi (22%) e PD-L1 positiva ( $\geq 1\%$ ) in 7/9 casi (77%), tra i 4 casi di metastasi epatica, essa è risultata PD-L1 negativa ( $< 1\%$ ) in 2/4 casi (50%) e PD-L1 positiva ( $\geq 1\%$ ) in 2/4 casi (50%); infine, il caso di metastasi polmonare è risultato PD-L1 negativo ( $< 1\%$ ) (1/1 casi – 100%) (Tab. V).

Considerazioni sui casi con neoplasia primitiva con PD-L1 negativo (<1%) (Tab. II)

I casi con PDL1 negativo (<1%) sulla neoplasia primitiva (9/34; 26%) avevano le seguenti caratteristiche:

1) ETA'

In questi casi l'età media era di 61 anni (range 33-84).

2) ISTOTIPO

In 8/9 casi (89%) si trattava di carcinomi infiltranti NST, in 1/9 casi (11%) di un carcinoma infiltrante di tipo metaplastico.

3) GRADO ISTOLOGICO

In tutti i casi (9/9; 100%) si trattava di carcinomi scarsamente differenziati (G3).

4) INDICE DI PROLIFERAZIONE (Ki67)

In questi casi l'indice proliferativo è risultato in media del 46% (range 20%-70%).

5) TILs

In questi casi il valore dei TILs è risultato <10% in 6/9 casi (67%), compreso tra 10% e 40% in 3/9 casi (33%) e >40% in nessun caso.

6) STATO RECETTORIALE e di HER-2

Si trattava in tutti i casi (9/9) di neoplasia triplo-negativa (RE neg, RP neg, HER-2 neg).

7) CONFRONTO TRA NEOPLASIA PRIMITIVA E METASTATICA

Dei 9 casi con neoplasia primitiva con PD-L1 negativo (<1%) in 1 caso PD-L1 è stato studiato anche sulla relativa metastasi epatica, ed anch'essa è risultata con PD-L1<1%.

Considerazioni sui casi testati solo su neoplasia metastatica e con PDL1 negativo (<1%) (Tab. III)

I casi testati solo su neoplasia metastatica e con PDL1 negativo (<1%) (3/9; 33%) avevano le seguenti caratteristiche:

1) SEDE

N. 2 metastasi linfonodali e n. 1 metastasi polmonare.

2) ETA'

In questi casi l'età media era di 55 anni (range 51-59).

3) ISTOTIPO

Si trattava in tutti i casi (3/3; 100%) di carcinomi infiltranti NST.

4) GRADO ISTOLOGICO DELLA NEOPLASIA PRIMITIVA

In 2/3 casi (67%) si trattava di carcinomi moderatamente differenziati (G2) ed in 1/3 casi (33%) di carcinomi scarsamente differenziati (G3).

5) INDICE DI PROLIFERAZIONE (Ki67)

In questi casi l'indice proliferativo è risultato mediamente del 22% (range 15%-30%).

#### 6) TILs

In questi casi il valore dei TILs è risultato <10% in 1/3 casi (33%), compreso tra 10% e 40% in 1/3 casi (33%) e >40% in nessun caso. Nella metastasi polmonare il TIL non è risultato valutabile.

#### 7) STATO RECETTORIALE e di HER-2

Si trattava in tutti i casi (3/3 casi) di neoplasie triplo-negative (RE neg, RP neg, HER-2 neg).

Considerazioni sui casi con neoplasia primitiva con PD-L1 positivo ( $\geq 1\%$ ) (Tab. II)

I casi con PDL1 positivo ( $\geq 1\%$ ) sulla neoplasia primitiva (25/34; 74%) avevano le seguenti caratteristiche:

#### 1) ETA'

In questi casi l'età media era di 59 anni (range 39-87).

#### 2) ISTOTIPO

In 24/25 casi (96%) si trattava di carcinomi infiltranti NST ed in 1/25 casi (4%) di un carcinoma lobulare infiltrante.

#### 3) GRADO ISTOLOGICO

In 1/25 casi (4%) si trattava di un carcinoma ben differenziato (G1), in 1/25 casi (4%) di un carcinoma moderatamente differenziato (G2) ed in 23/25 casi (92%) di carcinomi scarsamente differenziati (G3).

#### 4) INDICE DI PROLIFERAZIONE (Ki67)

In questi casi l'indice proliferativo è risultato mediamente del 44% (range 15%-70%).

#### 5) TILs

In questi casi il valore dei TILs è risultato <10% in 6/25 casi (24%), compreso tra 10% e 40% in 16/25 casi (64%) e >40% in 3/25 casi (12%). Interessante sottolineare che tutti i casi di neoplasia primitiva con elevato TILs (>40%) sono risultati PD-L1 positivi ( $\geq 1\%$ ).

#### 6) STATO RECETTORIALE e di HER-2

Si trattava in 21/25 casi (84%) di neoplasie triplo-negative (RE neg, RP neg, HER-2 neg); in 2/25 casi (8%) di neoplasie con HER-2 negativo a bassa espressione di RE (<10%) ed in 2/25 casi (8%) di neoplasie con HER-2 negativo, RE negativi e debole, focale espressione aberrante di RP.

#### 8) CONFRONTO TRA NEOPLASIA PRIMITIVA E METASTATICA

Dei 25 casi con neoplasia primitiva con PD-L1 positivo ( $\geq 1\%$ ) in 4 casi PD-L1 è stato studiato anche sulle relative metastasi. In 3 casi, tutte metastasi linfonodali, anche la metastasi è risultata PD-L1 positiva ( $\geq 1\%$ ). In 1 caso di metastasi epatica, essa è risultata PD-L1 negativa (<1%).

Considerazioni sui casi testati solo su neoplasia metastatica e con PD-L1 positivo ( $\geq 1\%$ ) (Tab. III)

I casi testati solo su neoplasia metastatica e con PDL1 positivo ( $\geq 1\%$ ) sulla neoplasia metastatica (6/9; 67%) avevano le seguenti caratteristiche:

1) SEDE

N. 4 metastasi linfonodali e n. 2 metastasi epatiche.

2) ETA'

In questi casi l'età media era di 56 anni (range 40-77).

3) ISTOTIPO

In 5/6 casi (83%) si trattava di metastasi di carcinomi infiltranti NST ed in 1/6 casi (17%) di metastasi di carcinoma lobulare infiltrante.

4) GRADO ISTOLOGICO DELLA NEOPLASIA PRIMITIVA

In 1/6 casi (17%) si trattava di un carcinoma ben differenziato (G1), in 2/6 casi (33%) di carcinomi moderatamente differenziati (G2) ed in 3/6 casi (50%) di carcinomi scarsamente differenziati (G3).

5) INDICE DI PROLIFERAZIONE (Ki67)

In questi casi l'indice proliferativo è risultato mediamente del 44% (range 30%-60%).

6) TILs

In questi casi il valore dei TILs è risultato  $<10\%$  in 2/6 casi (33%), compreso tra 10% e 40% in 2/6 casi (33%) e  $>40\%$  in in 2/6 casi (33%).

7) STATO RECETTORIALE e di HER-2

Si trattava in 4/6 casi (67%) di neoplasie triplo-negative (RE neg, RP neg, HER-2 neg) ed in 2/6 casi (33%) di neoplasie con HER-2 negativo a bassa espressione di RE ( $<10\%$ ).

## DISCUSSIONE

Il carcinoma della mammella è la neoplasia femminile più frequente nei Paesi industrializzati ed è la maggior causa di morbilità e mortalità oncologiche femminili. Tuttavia, la percentuale di mortalità dal 2015 è diminuita grazie anche ad una maggiore diffusione di programmi di screening, con la conseguente diagnosi precoce, e all'introduzione di nuove strategie terapeutiche.

Il 15-20% dei carcinomi della mammella è rappresentato dai carcinomi triplo-negativi (negativi per ER e PR e per HER2) che è generalmente una malattia più aggressiva, con una prognosi più sfavorevole, che non può beneficiare dell'ormonoterapia e di terapia anti-HER-2. [6]

Una delle strategie nella terapia farmacologica anti-tumorale più recentemente introdotte nella pratica clinica è l'immunoterapia che ha come obiettivo quello di sfruttare e migliorare il sistema immunitario interrompendo la regolazione immunitaria negativa che consente agli antigeni tumorali di sfuggire al sistema immunitario. In particolare si utilizzano anticorpi monoclonali anti-PD-L1 o anti-CTLA4, allo scopo di bloccare i checkpoint immunitari con miglioramento della citotossicità e della capacità proliferativa dei linfociti intra-tumorali.

Recentemente, l'utilizzo dell'immunoterapia è stato introdotto anche nella terapia del carcinoma della mammella, mutando lo standard di trattamento del cancro della mammella e migliorando le aspettative di sopravvivenza per queste pazienti. In particolare, in Italia è stato approvato l'utilizzo dell'anticorpo monoclonale anti-PD-L1 Atezolizumab in combinazione con chemioterapia (Nab-Paclitaxel), in pazienti non precedentemente sottoposti a chemioterapia per malattia metastatica (prima linea), nel trattamento del carcinoma mammario triplo-negativo non resecabile, localmente avanzato o metastatico, con un'espressione di PD-L1  $\geq 1\%$ .

Per la selezione dei pazienti candidati a terapia con Atezolizumab+Nab-Paclitaxel, lo stato di PD-L1 deve essere studiato con valutazione immunoistochimica di PD-L1 sulle cellule infiammatorie infiltranti la neoplasia (IC) utilizzando il saggio immunoistochimico Ventana SP142.

In questa tesi, abbiamo voluto studiare e descrivere l'espressione di PD-L1 (con clone SP142 Ventana) nella nostra casistica di carcinomi della mammella triplo-negativi, dove il medico Oncologo ne avesse fatto richiesta. Vogliamo segnalare che in alcuni casi la richiesta era pervenuta anche per casi ER-low positive (positività per ER  $<10\%$ ), PR-negativi, HER2-negativi o per casi ER-negativi, HER-2-negativi e con debole espressione aberrante di PR.

Osservando la nostra casistica, possiamo sottolineare che:

- 1) come descritto in Letteratura, nella maggioranza dei casi di trattava di neoplasie scarsamente differenziate (G3) e con un Ki67  $>30\%$ . [6]
- 2) nella maggior parte dei casi sia i carcinomi primitivi che quelli metastatici studiati sono risultati PD-L1-positivi (72%) (Tab. IV); in particolare, i carcinomi primitivi sono risultati positivi nel 74% dei casi (Tab. II); tra i casi dove solo il carcinoma metastatico è stato studiato, esso è



risultato PD-L1-positivo nel 67% dei casi (Tab. III), con percentuali più alte rispetto a quanto descritto in letteratura [33]

3) il 77% delle metastasi linfonodali è risultato PD-L1-positivo; il 50% delle metastasi epatiche è risultata PD-L1 positiva; l'unica metastasi polmonare studiata è risultata PD-L1-negativa (Tab. V);

4) pur con un numero di casi limitato, il confronto tra carcinoma primitivo e carcinoma metastatico (possibile in 5 casi), ha mostrato che in 4/5 casi l'espressione di PD-L1 nel carcinoma primitivo corrispondeva a quella riscontrata nella metastasi, in 1/4 casi, invece, la neoplasia primitiva è risultata PD-L1-positiva, mentre la metastasi epatica è risultata PD-L1-negativa;

5) tra le neoplasie primitive con PD-L1 positivo, TILs aveva più frequentemente un valore intermedio (compreso tra 10% e 40%), mentre tra le neoplasie primitive con PD-L1 negativo, TILs era più frequentemente basso (<10%). Inoltre, tutti i casi con un valore alto di TILs (>40%) sono risultati PD-L1-positivi (Fig. 12) (Tab. IV), confermando la correlazione tra il valore di TILs e lo stato di PD-L1.

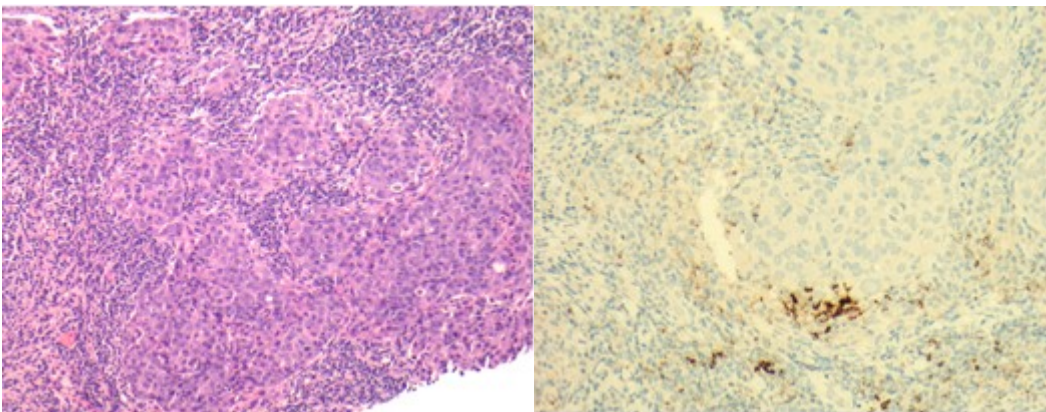


Figura 12: carcinoma della mammella con TILs>40% (vedi Fig. 8) e relativa colorazione per PD-L1 fortemente positiva (EE; 10x e PD-L1 SP142; 20x)

6) la maggior parte dei casi PD-L1-positivi (84%) aveva una positività vicina al cut off (compresa tra 1% e 10%). Questo dato evidenzia l'importanza di un'attenta valutazione dei casi, per evitare di etichettare come negativi preparati con un valore di PD-L1 di poco superiore all'1% (falsi negativi) e l'importanza di un trattamento adeguato dei campioni in fase pre-analitica.

Tab. II

## Carcinoma\_primitivo

**CARCINOMA PRIMITIVO (N. 34 casi)**

	PD-L1<1%	PD-L1>=1%	TOTALE
NUMERO	9/34 (26%)	25/34 (74%)	34/34 (100%)
ETA' (anni)	61 (33-84)	59 (39-87)	62 (33-87)
ISTOTIPO NST	8/9 (89%)	24/25 (96%)	32/34 (94%)
lobulare	0/9 (0%)	1/25 (4%)	1/34 (3%)
metaplastico	1/9 (11%)	0/25 (0%)	1/34 (3%)
GRADO G1	0/9 (0%)	1/25 (4%)	1/34 (3%)
G2	0/9 (0%)	1/25 (4%)	1/34 (3%)
G3	9/9 (100%)	23/25 (92%)	32/34 (94%)
Ki67	46% (20%-70%)	44% (15%-70%)	44% (15%-70%)
TILs <10%	6/9 (67%)	6/25 (24%)	12/34 (35%)
10-40%	3/9 (33%)	16/25 (64%)	19/34 (56%)
>40%	0/9 (0%)	3/25 (12%)	3/34 (9%)

Tab. III

## Metastasi

**CARCINOMA METASTATICO (N. 9 casi)**

	PD-L1<1%	PD-L1>=1%	TOTALE
NUMERO	3/9 (33%)	6/9 (67%)	9/9(100%)
ETA' (anni)	55 (51-59)	56 (40-77)	56 (40-77)
ISTOTIPO NST	3/3 (100%)	5/6 (83%)	8/9 (89%)
lobulare	0/3 (100%)	1/6 (17%)	1/9 (11%)
GRADO G1	0/3 (0%)	1/6 (17%)	1/9 (11%)
G2	2/3 (67%)	2/6 (33%)	4/9 (44%)
G3	1/3 (33%)	3/6 (50%)	4/9 (44%)
Ki67	22% (15%-30%)	44% (30-60%)	39% (15%-60%)
TILs <10%	1/2* (50%)	2/6 (33%)	3/8* (37,5%)
10-40%	1/2* (50%)	2/6 (33%)	3/8* (37,5%)
>40%	0/2 (0%)	2/6 (33%)	2/8* (25%)

\* in metastasi polmonare TILs non valutabile

Tab. IV

Totale

**CASISTICA TOTALE (N. 43 casi)**

	PD-L1<1%	PD-L1>=1%	TOTALE
NUMERO	12/43 (28%)	31/43 (72%)	43/43 (100%)
ETA' (anni)	60 (33-84)	61 (39-87)	60 (33-87)
ISTOTIPO NST	11/12 (92%)	29/31 (94%)	40/43 (93%)
lobulare	0/12 (0%)	2/31 (6%)	2/43 (5%)
metaplastico	1/12 (8%)	0/31 (0%)	1/43 (2%)
GRADO G1	0/12 (0%)	2/31 (6%)	2/43 (5%)
G2	2/12 (17%)	3/31 (10%)	5/43 (11%)
G3	10/12 (83%)	26/31 (84%)	36/43 (84%)
Ki67	39% (15%-70%)	44% (15%-70%)	44% (15%-70%)
TILs <10%	7/11* (64%)	8/31 (26%)	15/42* (36%)
10-40%	4/11* (36%)	18/31 (58%)	22/42* (52%)
>40%	0/11* (0%)	5/31 (16%)	5/42* (12%)

\* in metastasi polmonare TILs non valutabile

Tab. V

SEDE	N.	PD-L1<1%	PD-L1>=1%
Linfonodo	9	2/9 (22%)	7/9 (77%)
Fegato	4	2/4 (50%)	2/4 (50%)
Polmone	1	1/1 (100%)	0/1 (0%)

## **CONCLUSIONI**

La valutazione immunohistochimica di PD-L1 con clone SP142 Ventana nel carcinoma della mammella triplo-negativo in fase avanzata o metastatica è un requisito indispensabile per la somministrazione del farmaco immunoterapico (Atezolizumab) in combinazione con il farmaco chemioterapico (Nab-Paclitaxel).

In questa tesi abbiamo descritto come viene effettuata tale valutazione, sottolineando l'importanza delle fasi pre-analitica e analitica, e le caratteristiche della casistica studiata, che, pur con un numero di casi non elevato, sono in linea con quanto rilevato in Letteratura.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] LINEE GUIDA AIOM 2020 NEOPLASIE DELLA MAMMELLA
- [2] Slepicka PF, Cyrill SL, Dos Santos CO. Pregnancy and Breast Cancer: Pathways to Understand Risk and Prevention. *Trends Mol Med*. 2019 Oct;25(10):866-881. doi: 10.1016/j.molmed.2019.06.003. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31383623.
- [3] Bakken K, Fournier A, Lund E, Waaseth M, Dumeaux V, Clavel-Chapelon F, Fabre A, Hémon B, Rinaldi S, Chajes V, Slimani N, Allen NE, Reeves GK, Bingham S, Khaw KT, Olsen A, Tjønneland A, Rodriguez L, Sánchez MJ, Etxezarreta PA, Ardanaz E, Tormo MJ, Peeters PH, van Gils CH, Steffen A, Schulz M, Chang-Claude J, Kaaks R, Tumino R, Gallo V, Norat T, Riboli E, Panico S, Masala G, González CA, Berrino F. Menopausal hormone therapy and breast cancer risk: impact of different treatments. *The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. *Int J Cancer*. 2011 Jan 1;128(1):144-56. doi: 10.1002/ijc.25314. PMID: 20232395.
- [4] Ibrahim EM, Abouelkhair KM, Kazkaz GA, Elmasri OA, Al-Foheidi M. Risk of second breast cancer in female Hodgkin's lymphoma survivors: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2012 May 28;12:197. doi: 10.1186/1471-2407-12-197. PMID: 22639888; PMCID: PMC3416585.
- [5] Pizot C, Boniol M, Mullie P, Koechlin A, Boniol M, Boyle P, Autier P. Physical activity, hormone replacement therapy and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer*. 2016 Jan;52:138-54. doi: 10.1016/j.ejca.2015.10.063. Epub 2015 Dec 11. PMID: 26687833.
- [6] [WHO Classification of Tumours Editorial Board. Breast Tumours. WHO classification of tumours 5th edition, Volume 2. 2019]
- [7] Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403-10. doi: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x. PMID: 1757079.
- [8] Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Richardson AL, Schnitt SJ, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Badve S, Ellis IO. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res*. 2010;12(4):207. doi: 10.1186/bcr2607. Epub 2010 Jul 30. PMID: 20804570; PMCID: PMC2949637.
- [9] Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, Hayes DF, Lakhani SR, Chavez-MacGregor M, Perlmutter J, Perou CM, Regan MM, Rimm DL, Symmans WF, Torlakovic EE, Varella L, Viale G, Weisberg TF, McShane LM, Wolff AC. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2020 Apr 20;38(12):1346-1366. doi: 10.1200/JCO.19.02309. Epub 2020 Jan 13. PMID: 31928404.
- [10] Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, Bilous M, Ellis IO, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, McShane LM,

- Dowsett M. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med*. 2018 Nov;142(11):1364-1382. doi: 10.5858/arpa.2018-0902-SA. Epub 2018 May 30. PMID: 29846104.
- [11] Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, Wienert S, Van den Eynden G, Baehner FL, Penault-Llorca F, Perez EA, Thompson EA, Symmans WF, Richardson AL, Brock J, Criscitiello C, Bailey H, Ignatiadis M, Floris G, Sparano J, Kos Z, Nielsen T, Rimm DL, Allison KH, Reis-Filho JS, Loibl S, Sotiriou C, Viale G, Badve S, Adams S, Willard-Gallo K, Loi S; International TILs Working Group 2014. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015 Feb;26(2):259-71. doi: 10.1093/annonc/mdu450. Epub 2014 Sep 11. PMID: 25214542; PMCID: PMC6267863.
- [12] Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2016 Oct 18;4:59. doi: 10.1186/s40425-016-0165-6. PMID: 27777769; PMCID: PMC5067916.
- [13] Won KA, Spruck C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *Int J Oncol*. 2020 Dec;57(6):1245-1261. doi: 10.3892/ijo.2020.5135. Epub 2020 Oct 16. PMID: 33174058; PMCID: PMC7646583.
- [14] Liu Z, Li M, Jiang Z, Wang X. A Comprehensive Immunologic Portrait of Triple-Negative Breast Cancer. *Transl Oncol*. 2018 Apr;11(2):311-329. doi: 10.1016/j.tranon.2018.01.011. Epub 2018 Feb 4. PMID: 29413765; PMCID: PMC5884188.
- [15] Tan Q, Yin S, Zhou D, Chi Y, Man X, Li H. Potential Predictive and Prognostic Value of Biomarkers Related to Immune Checkpoint Inhibitor Therapy of Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol*. 2022 Apr 29;12:779786. doi: 10.3389/fonc.2022.779786. PMID: 35646659; PMCID: PMC9134495.
- [16] Zhou Y, Tian Q, Wang BY, Yang J, Zhao SD, Yang J. The prognostic significance of TILs as a biomarker in triple-negative breast cancer: what is the role of TILs in TME of TNBC? *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021 Apr;25(7):2885-2897. doi: 10.26355/eurrev\_202104\_25542. PMID: 33877653.
- [17] Ruffell B, Au A, Rugo HS, Esserman LJ, Hwang ES, Coussens LM. Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 21;109(8):2796-801. doi: 10.1073/pnas.1104303108. Epub 2011 Aug 8. PMID: 21825174; PMCID: PMC3287000.
- [18] Gao G, Wang Z, Qu X, Zhang Z. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2020 Mar 4;20(1):179. doi: 10.1186/s12885-020-6668-z. PMID: 32131780; PMCID: PMC7057662.



- [19] Boussiotis VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med*. 2016 Nov 3;375(18):1767-1778. doi: 10.1056/NEJMra1514296. PMID: 27806234; PMCID: PMC5575761.
- [20] Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol*. 2015 Apr;36(4):265-76. doi: 10.1016/j.it.2015.02.008. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25797516; PMCID: PMC4393798.
- [21] El Bairi K, Haynes HR, Blackley E, Fineberg S, Shear J, Turner S, de Freitas JR, Sur D, Amendola LC, Gharib M, Kallala A, Arun I, Azmoudeh-Ardalan F, Fujimoto L, Sua LF, Liu SW, Lien HC, Kirtani P, Balancin M, El Attar H, Guleria P, Yang W, Shash E, Chen IC, Bautista V, Do Prado Moura JF, Rapoport BL, Castaneda C, Spengler E, Acosta-Haab G, Frahm I, Sanchez J, Castillo M, Bouchmaa N, Md Zin RR, Shui R, Onyuma T, Yang W, Husain Z, Willard-Gallo K, Coosemans A, Perez EA, Provenzano E, Ericsson PG, Richardet E, Mehrotra R, Sarancone S, Ehinger A, Rimm DL, Bartlett JMS, Viale G, Denkert C, Hida AI, Sotiriou C, Loibl S, Hewitt SM, Badve S, Symmans WF, Kim RS, Pruneri G, Goel S, Francis PA, Inurriagarro G, Yamaguchi R, Garcia-Rivello H, Horlings H, Afqir S, Salgado R, Adams S, Kok M, Dieci MV, Michiels S, Demaria S, Loi S; International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. The tale of TILs in breast cancer: A report from The International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. *NPJ Breast Cancer*. 2021 Dec 1;7(1):150. doi: 10.1038/s41523-021-00346-1. PMID: 34853355; PMCID: PMC8636568.
- [22] Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol*. 2020 Aug 17;30(16):R921-R925. doi: 10.1016/j.cub.2020.06.081. PMID: 32810447; PMCID: PMC8194051.
- [23] Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020 Mar 1;10(3):727-742. PMID: 32266087; PMCID: PMC7136921.
- [24] Heeke AL, Tan AR. Checkpoint inhibitor therapy for metastatic triple-negative breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2021 Jun;40(2):537-547. doi: 10.1007/s10555-021-09972-4. Epub 2021 Jun 8. PMID: 34101053; PMCID: PMC8184866.
- [25] Tan TJ, Chan JJ, Kamis S, Dent RA. What is the role of immunotherapy in breast cancer? *Chin Clin Oncol*. 2018 Apr;7(2):13. doi: 10.21037/cco.2018.04.01. PMID: 29764158.
- [26] Rozenblit M, Huang R, Danziger N, Hegde P, Alexander B, Ramkissoon S, Blenman K, Ross JS, Rimm DL, Pusztai L. Comparison of PD-L1 protein expression between primary tumors and metastatic lesions in triple negative breast cancers. *J Immunother Cancer*. 2020 Nov;8(2):e001558. doi: 10.1136/jitc-2020-001558. PMID: 33239417; PMCID: PMC7689582.
- [27] Atezolizumab Combo Approved for PD-L1-positive TNBC. *Cancer Discov*. 2019 May;9(5):OF2. doi: 10.1158/2159-8290.CD-NB2019-038. Epub 2019 Mar 20. PMID: 30894361.

- [28] Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Hegg R, Im SA, Shaw Wright G, Henschel V, Molinero L, Chui SY, Funke R, Husain A, Winer EP, Loi S, Emens LA; IMpassion130 Trial Investigators. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Nov 29;379(22):2108-2121. doi: 10.1056/NEJMoa1809615. Epub 2018 Oct 20. PMID: 30345906.
- [29] Pérez-García J, Soberino J, Racca F, Gion M, Stradella A, Cortés J. Atezolizumab in the treatment of metastatic triple-negative breast cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2020 Sep;20(9):981-989. doi: 10.1080/14712598.2020.1769063. Epub 2020 May 25. PMID: 32450725.
- [30] Interpretation Guide for Triple-Negative Breast Carcinoma (TNBC). © 2019 Ventana Medical Systems, Inc. and Roche Diagnostics International
- [31] Ahmed SS, Thike AA, Zhang K, Lim JC, Tan PH. Clinicopathological characteristics of oestrogen receptor negative, progesterone receptor positive breast cancers: re-evaluating subsets within this group. *J Clin Pathol*. 2017 Apr;70(4):320-326. doi: 10.1136/jclinpath-2016-203847. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27612503.
- [32] Kunc M, Biernat W, Senkus-Konefka E. Estrogen receptor-negative progesterone receptor-positive breast cancer - "Nobody's land" or just an artifact? *Cancer Treat Rev*. 2018 Jun;67:78-87. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.05.005. Epub 2018 May 16. PMID: 29772460.
- [33] Hope S, Rugo, Sherene Loi, Sylvia Adams, Peter Schmid, Andreas Schneeweiss, Carlos H. Barrios, Hiroji Iwata, Véronique Diéras, Eric P. Winer, Mark M. Kockx, Dieter Peeters, Stephen Y. Chui, Jennifer C. Lin, Anh Nguyen Duc, Giuseppe Viale, Luciana Molinero, Leisha A. Emens Performance of PD-L1 immunohistochemistry assays in unresectable locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer: post hoc analysis of IMpassion130.