



Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di laurea in Biologia

Tesi di Laurea

*Espressione di PD-L1 nel Linfoma a Grandi Cellule B
Diffuso*

Tutor: Chiar.mo Prof. Cesare Montecucco
Dipartimento di Scienze Biomediche

Co-tutor: Dr.ssa Natalina Antonella Marchi

Laureanda: Giulia Rossi

ANNO ACCADEMICO 2016/2017

Niente nella vita va temuto, dev'essere solamente compreso. Ora è tempo di comprendere di più, così possiamo temere di meno

(Marie Curie)

INDICE

Introduzione	pag. 7
1.1 Linfomi Non-Hogkin.....	pag. 9
1.2 Cancerogenesi del linfoma.....	pag. 10
1.3 Diagnosi istopatologica.....	pag. 12
2. Il linfoma a grandi cellule B diffuso.....	pag. 13
2.1 Eziologia.....	pag. 14
2.2 Profilo molecolare.....	pag. 15
2.3 Terapia.....	pag. 15
3. Scopo della ricerca.....	pag. 16
4. Materiali e metodi.....	pag. 17
4.1 Metodica Immunoistochimica.....	pag. 19
5. Risultati e analisi.....	pag. 23
5.1 Descrizione dei Campioni.....	pag. 24
6. Discussioni e conclusioni.....	pag. 27
7. Bibliografia.....	pag. 29

INTRODUZIONE

Il termine linfoma indica un gruppo eterogeneo di neoplasie che originano da cellule immunologicamente attive e che interessano il sistema linfatico. Il sistema linfatico è costituito dalle cellule preposte alla difesa dell'organismo: i linfociti che intervengono in diverse zone del corpo quali milza, timo, midollo osseo e formano degli agglomerati chiamati linfonodi. Il linfoma, perciò, può interessare tali organi, ma anche altri. Le neoplasie maligne solide del sistema linfopoietico si inseriscono nella più ampia categoria di Neoplasie Linfoidi o Malattie Linfoproliferative Maligne. Si distinguono in base al tipo di proliferazione monoclonale di linfociti mutati nelle diverse fasi di maturazione riferendosi al tipo di linfoma e al livello tissutale (linfonodi o stazioni extra-nodali). Analisi immunoistochimiche e citologiche hanno permesso una comparazione con le leucemie, che sono tumori delle cellule del sangue. Molte leucemie e linfomi sono identici dal punto di vista di clone mutato e ciò che cambia è la sede iniziale di colonizzazione neoplastica: Midollo Osseo per la leucemia e Linfonodo per il linfoma (Bonadonna G. et al, 2007; Bea S. et al, 2005). I linfomi maligni rappresentano il quinto tipo di tumore per frequenza nel mondo occidentale, con una incidenza pari a circa 19-20 casi per 100.000 abitanti. L'incidenza è ampiamente influenzata da fattori geografici razziali e temporali ed è superiore nei paesi industrializzati, nei soggetti di sesso maschile e di razza bianca. Sono tra le neoplasie più studiate, a causa della loro elevata incidenza e per la loro estrema variabilità. Dopo una fase epidemica che nei paesi occidentali ha portato ad un incremento dei casi linfoma del 50% circa dagli anni '70 agli anni '90', numerosi studi concordano sul fatto che l'incidenza delle malattie linfoproliferative si sia attualmente stabilizzata o registri solo incrementi minori (Linee Guida AIOM, 2013). I linfomi sono distinti in due grandi categorie: i Linfomi (o Morbo) di Hodgkin e i Linfomi Non-Hodgkin. Tale suddivisione è stata creata per meglio distinguerli dalle altre neoplasie maligne ed è stata rivista più volte a partire dalla storica classificazione di Thomas Hodgkin che nel 1832 descrisse per primo il linfoma, a cui diede il nome, nel libro *On Some Morbid Appearance of the Absorbent Glands And Spleen*, alle più recenti classificazioni della World Health Organization (WHO) nel 2008 e nel 2016.

1. LINFOMI NON-HODGKIN

I linfomi Non- Hodgkin sono processi neoplastici che riproducono le caratteristiche morfologiche, fenotipiche, genotipiche e talvolta anche una o più tappe della maturazione degli elementi linfoidi. Costituiscono un gruppo estremamente complesso di neoplasie aventi caratteristiche diverse in base al clone coinvolto dalla noxa neoplastica: membro pro-apoptotico della famiglia dei geni Bcl-2, che deve il suo nome a B-cell lymphoma 2. Variano da forme indolenti (rappresentate principalmente dal linfoma follicolare) a forme altamente aggressive che necessitano di diverso approccio terapeutico (Bonadonna G. et al, 2007).

Si presentano in genere con localizzazione primitiva in sede linfonodale. Negli ultimi decenni l'incidenza dei di LNH risulta in continuo aumento nella maggior parte dei Paesi industrializzati, attestandosi al quinto posto tra le varie neoplasie per incidenza. I linfomi non Hodgkin rappresentano il 3-5% di tutte le neoplasie maligne, registrandosi attualmente in Italia circa 10.000 casi/anno con un tasso di incidenza di 14,6 casi/100.000 abitanti/anno (uno dei più alti in Europa), che aumenta parallelamente all'età (picchi di incidenza specifici per i diversi tipi di LNH), con tassi di mortalità standardizzati sulla popolazione mondiale di 5,8/100.000 abitanti/anno; la probabilità di sopravvivenza a 5 anni è passata dal 35% al 80% dal 1965 al 1985, rendendole una fra le categorie di tumori più facilmente curabili.

L'eziologia dei linfomi è a tutt'oggi sconosciuta nel 70% dei casi. Il 15-20% potrebbe essere ricollegato ad infezioni da patogeni quali Helicobacter Piloni (linfoma follicolare primitivo del duodeno, MALT), virus di Epstein-Barr (linfoma di Burkitt), virus dell'epatite C, HTLV-1 (leucemia/linfoma dell'adulto a cellule T). Il 5% invece viene ricondotto a situazioni di immunodeficienza (primaria, associata ad HIV, post-trapianto, da utilizzo di metotrexate) o autoimmunità (sindrome di Sjogren, tiroidite di Hashimoto, artrite reumatoide, ecc.) (Gong Y. et al, 2017; Boyer DF. et al, 2107).

1.2 CANCEROGENESI DEL LINFOMA

La cancerogenesi dei linfomi è molto vicina al modello “multi-steps” dove sono necessarie over-espressioni di un certo oncogene seguite dall’attivazione di altri proto-oncogeni e/o dall’ inattivazione di geni oncosoppressori. L’attivazione dei proto-oncogeni si ha quando tale gene viene traslocato nell’area controllata da un regolatore che permette la trascrizione in modo costitutivo (nel caso dei linfociti B, un tipico regolatore sempre attivo è quello delle immunoglobuline); oppure un oncogene può diventare costitutivamente espresso quando una traslocazione ne porta la fusione con un altro gene: se il prodotto proteico ibrido (chimerico) ha perso i domini di regolazione o attivazione, questa proteina (interessata nelle vie di segnalazione intracellulari di proliferazione) risulta sempre attiva. L’attivazione di un proto-oncogene può avvenire anche per mutazione puntiforme del suo regolatore fisiologico, che a seguito della mutazione over-esprime il suo gene. Infine, anche eventi epigenetici possono portare alla maggiore capacità trascrizionale dell’oncogene (metilazione del DNA e acetilazione degli istoni). Il quadro citologico e istologico risulta estremamente complesso e la classificazione di queste neoplasie risulta essere tra le più complesse in campo oncologico, a motivo delle enormi difficoltà nell’interpretazione delle numerosissime sottovarianti e della diversità terminologica a cui si è fatto riferimento in passato.

Il primo contributo classificativo è stato quello di Rappaport (1966) basato su criteri puramente morfologici; dopo di esso sono seguite 2 classificazioni morfologico-cliniche (Working Formulation, WF-1980 / Update Kiel Classification, UKC-1988), in seguito, nel 1994, fu proposta la classificazione europeo-americana: la REAL (Revised European American Lymphoma); attualmente quella utilizzata è la classificazione secondo World Health Organization (WHO) (Tab.1), revisionata nel 2008, che suddivide le neoplasie di derivazione B (85% dei LNH) o T e queste a loro volta sono classificate in base alla maturità delle cellule neoplastiche (precursori della linea linfoide o cellule mature). Infatti i diversi tipi di LNH rappresentano l’espansione di un elemento linfoide B o T bloccato in una fase maturativa ben definita dell’iter differenziativo della filiera linfoide B o T; più un linfoma ha aspetto maturo minore sarà l’aggressività.

Classificazione WHO

<i>Neoplasie dei precursori dei linfociti B</i>	<i>Neoplasie dei precursori dei linfociti T</i>
<i>Leucemia/linfoma linfoblastico dei precursori B</i>	<i>Leucemia/linfoma linfoblastico dei precursori T</i>
<i>Neoplasie dei linfociti B maturi (periferiche)</i>	<i>Neoplasie dei linfociti T ed NK maturi (periferiche)</i>
<i>Leucemia linfatica cronica/ linfoma a piccoli linfociti</i> <i>Leucemia prolinfocitica a cellule B</i> <i>Linfoma linfoplasmacitico</i> <i>Linfomi della zona marginale nodale e splenico</i> <i>Linfoma della zona marginale Extranodale</i> <i>Linfoma mantellare</i> <i>Linfoma follicolare</i> <u>Linfoma a grandi cellule B diffuse</u> <i>Plasmocitoma/ mieloma plasmacellulare</i> <i>Linfoma di Burkitt</i>	<i>Leucemia prolinfocitica a cellule T</i> <i>Leucemia a grandi linfociti T granulari</i> <i>Micosi fungoide/ Sindrome di Sézary</i> <i>Linfoma a cellule T periferiche, non altrimenti specificato</i> <i>Linfoma a grandi cellule anaplastiche</i> <i>Linfoma angioimmunoblastico a cellule T</i> <i>Linfoma a cellule T tipo enteropatia</i> <i>Linfoma panniculato a cellule T</i> <i>Linfoma epatosplenico a cellule T</i> <i>Leucemia/Linfoma a cellule T dell'adulto</i> <i>Linfoma a cellule NK/T tipo nasale</i> <i>Leucemia a cellule NK</i>
<i>Linfoma di Hodgkin</i>	
<i>A Prevalenza Linfocitaria, sottotipi:</i> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Nodulare</i> - <i>Diffuso</i> 	<i>Linfoma di Hodgkin classico, sottotipi:</i> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Sclerosi nodulare</i> - <i>Cellularità mista</i> - <i>Deplezione linfocitaria</i> - <i>Ricco di linfociti</i>

Tab. 1: Classificazione dei Linfomi

1.3 DIAGNOSI ISTOPATOLOGICA

I linfomi si manifestano o con interessamento dei linfonodi superficiali, dando linfadenomegalia apprezzabile alla palpazione o all'ispezione (si può avere un ingrandimento evidente dei linfonodi anche nel giro di pochi giorni, specie se il linfoma è molto aggressivo), o con linfopatia profonda, nel qual caso si manifesterà con sintomi relativi alle strutture che vengono compresse dai linfonodi colpiti, infine può dare alterazioni specifiche d'organo se la sua primitiva localizzazione è extra-nodale.

Per eseguire la diagnosi di LNH come nell'LH è necessaria la biopsia di un linfonodo colpito o della regione vicino ad essa: si ottengono sezioni istologiche da campioni linfonodali escissi chirurgicamente.

Quando non si apprezzano linfonodi superficiali patologici si cerca di ottenere un campione istologico anziché uno striscio citologico attraverso l'utilizzo dell'ago biopsia e tecniche ecografiche come la TAC (Computed Axial Tomography) e la PET (Positron Emission Tomography) indispensabili per individuare l'esatta sede della malattia. Tali procedure sono anche efficaci per valutare la ripresa o la progressione di malattia in pazienti con diagnosi di linfoma già stabilita in precedenza (linee guida AIOM, 20213).

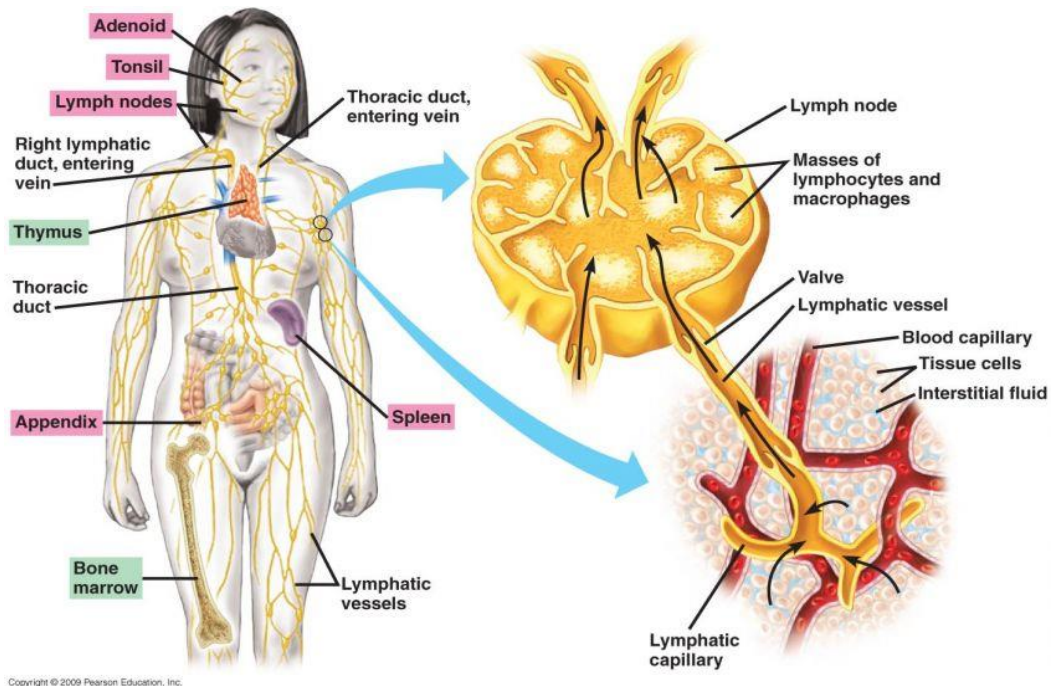


Fig. 1: Anatomia linfonodo

2. IL LINFOMA A GRANDI CELLULE B DIFFUSO (DLBCL)

Il linfoma a grandi cellule B diffuso (Diffuse Large B Cell Lymphoma), oggetto del nostro studio, è il più frequente tipo di LNH negli adulti (Blood. 1997;89:3909-39), viene definito come una neoplasia delle cellule mature B, caratterizzate da un profilo di proliferazione diffusa e da una dimensione nucleare maggiore o uguale a quella dei normali macrofagi o più delle volte quella di un normale linfocita.

Si riconoscono DLBCL primitivi, quando si sviluppano “de novo” e forme secondarie, che derivano dalla trasformazione di un precedente linfoma indolente. Può essere linfonodale o extralinfonodale e dal punto di vista clinico è una malattia a decorso aggressivo (Fingazio M. et al, 2011).

E' estremamente eterogeneo sia in termini istopatologici e molecolari che per quanto riguarda il comportamento clinico e la risposta terapeutica.

Il DLBCL risulta essere il linfoma più comune nel mondo, contando approssimativamente circa il 30% di tutte le neoplasie linfoidi. Questi tumori originano da cellule B trasformate contenenti ipermutazioni somatiche di geni immunoglobulinici.

Sebbene il DLBCL sia di solito considerato come una specifica categoria, la notevole diversità in termini di comportamento clinico, aspetti morfologici ed alterazioni genetiche e molecolari rispetto ad altri tipi di linfomi, suggerisce che questi tumori rappresentino un gruppo piuttosto eterogeneo di neoplasie piuttosto che una singola entità clinico-patologica (Colomo L et al. 2003; Bea S et al. 2005). E' costituito da cellule B attivate di grossa taglia con pattern di crescita diffuso ed alto indice di proliferazione. La popolazione neoplastica tipicamente sovverte la normale architettura del linfonodo o del tessuto extralinfonodale con un pattern diffuso (ES Jaffe et al. WHO 2001).

2.1 EZIOLOGIA

Ad oggi non è possibile definire con certezza se esista un comune percorso molecolare alla base della trasformazione in DLBCL a partire da differenti condizioni cliniche, oppure se la trasformazione da un disordine linfoproliferativo B indolente ad uno aggressivo segua strade diverse a seconda del tipo iniziale di malattia. Tra i fattori di rischio noti per lo sviluppo di un DLBCL, vi sono le condizioni di immunodeficienza, tra cui l'infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV), il trapianto d'organo solido e le terapie immunosoppressive prolungate.

Durante la normale maturazione dei linfociti B, due distinte modificazioni del DNA alterano il recettore delle cellule B: l'ipermutazione somatica e la class switch recombination. Entrambi questi meccanismi richiedono l'intervento dell'enzima activation-induced cytidine deaminase (AID) . La class switch recombination cambia la classe della catena pesante delle immunoglobuline da IgM a IgG, IgA o IgE, mentre l'ipermutazione somatica agisce modificando la regione variabile delle immunoglobuline, creando una popolazione di cellule B con affinità aumentata (o ridotta) per un particolare antigene. Queste modificazioni genetiche sono essenziali per una risposta immune normale, ma sono anche una fonte di danno al DNA che può diventare patologico, o meglio patogenetico, nei linfomi. L'enzima AID gioca numerosi ruoli nella linfomagenesi. Queste mutazioni possono accumularsi per un difetto nel meccanismo di riparazione del danno al DNA e/o per selezione di cellule che portano mutazioni oncogenetiche (Fingazio M. et al, 2011).

2.2 PROFILO MOLECOLARE

L'analisi tramite gene expression profiling (GEP) dei DLBCL ha permesso di risolvere a livello massimo di sensibilità la eterogeneità biologica del DLBCL, identificando due categorie maggiori sulla base di pattern di espressione genica:

- una categoria di DLBCL caratterizzata da profilo di espressione genica delle cellule B del centro germinativo (Germinal Center B Cell);
- una categoria di DLBCL con profilo di espressione genica simile a quello delle cellule B periferiche attivate (Activated B Cell); (Chiappella A. et al, 2011).

2.3 TERAPIA

Per quanto riguarda la terapia, in questi ultimi anni la chemioterapia si è imposta come il trattamento principale nei pazienti portatori di LNH e numerose sono le associazioni di chemioterapici proposte.

Lo sviluppo dell'immunoterapia ha aperto nuovi scenari nel trattamento di queste neoplasie. Gli antigeni di superficie espressi dalle cellule B neoplastiche sono target sfruttabili per la sieroterapia.

IMMUNOTERAPIA

L'immunoterapia è diventata una strategia terapeutica sempre più utilizzata con i pazienti malati di cancro.

Si avvale di un'ampia gamma di approcci terapeutici per ottenere una risposta immunitaria anti tumorale mirata, grazie allo sfruttamento del sistema immunitario.

Il goal dell'immunoterapia è abilitare il sistema immunitario del paziente a riconoscere le cellule cancerose ed ucciderle. Ci sono 2 distinti tipi di immunoterapia:

Immunoterapia passiva usa componenti del sistema immune per dirigere l'attività citotossica mirata contro le cellule cancerose senza necessariamente iniziare una risposta immune nel paziente.

Immunoterapia attiva innesca una risposta immune nel paziente.

Le strategie dell'immunoterapia passiva includono l'uso degli anticorpi monoclonali (mAbs) prodotti da cellule B in risposta ad un antigene specifico.

I primi tre e più importanti farmaci antitumorali nel 2012 sono stati anticorpi monoclonali.

- Rituximab che agisce anticorpo monoclonale anti CD20
- Trastuzumab anti Her 2
- Cetuximab anti-EGFR

Infine si inserisce in questa categoria di farmaci anche Pembrolizumab, attualmente validato e utilizzato solo per il carcinoma non a piccole cellule del polmone. Per guidare attivamente una risposta immune sono stati sviluppati vaccini terapeutici contro il cancro. Il vantaggio delle immunoterapie attive è che esse forniscono una duratura attività antitumorale impegnando sia le armi innate che adattive della risposta immune. Le cellule tumorali portano sulla loro superficie alti livelli di PD-L1, permettendo l'attivazione del recettore inibitorio PD-1 su alcune cellule T che infiltrano l'ambiente tumorale, effettivamente spostando quelle cellule. Infatti l'up-regulation dei livelli di espressione di PD-L1 è stata dimostrata in alcuni differenti tipi di cancro (melanoma 40-100%), NSCLC (35-93%) e mieloma multiplo (93%) e alti livelli di PD-L1 sono stati connessi a scarsi risultati clinici. La progettazione di terapie che specificatamente bersagliano i meccanismi di evasione immune è un approccio terapeutico attrattivo poiché l'abilità del tumore di sopprimere la risposta immune può seriamente minare l'efficacia clinica delle terapie antitumorali. Il primo agente mirato alla via PD-1 ad entrare nei test clinici è stato il Nivolumab (Ab monoclonale IgG4 mirato al PD-1).

3. SCOPO DELLA RICERCA

In questo studio è stata valutata l'utilità della quantificazione di PD-L1 come marcatore prognostico e predittivo di risposta alla terapia, data l'estrema variabilità molecolare all'interno dei linfomi non Hodgkin, tipologia linfomi diffusi a grandi cellule B, che si traduce in una grande variabilità individuale nella risposta terapeutica e prognostica. L'asse PD-1/PD-L1 esplica un ruolo chiave nel mantenimento dell'immunosoppressione, come meccanismo base della prevenzione dell'autoimmunità e della preservazione dell'integrità tissutale.

Il PD-L1 è una proteina transmembrana, che down-regola la risposta immunitaria attraverso il legame con i suoi due recettori inibitori:

- Programmed death-1 (PD-1):

È una proteina transmembrana di 288 amminoacidi, appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline, identificata per la prima volta nelle cellule apoptotiche, ma si è scoperto avere anche una funzione fondamentale nella modulazione della risposta immune, in particolare quella T-mediata.

Il legame tra PD-L1 e PD-1 è responsabile della inibizione della proliferazione delle cellule T (Fig. 1).

- B7.1:

È una molecola espressa sull'antigene della cellula T attivata.

L'interazione tra PD-L1 che si lega a B7.1 sulle cellule T porta a una down-regolazione della risposta immunitaria con l'inibizione dell'attivazione delle cellule T e della produzione di citochine (Brown JA et al, 2003). Il PD-L1 è per lo più espresso eterogeneamente, ma è possibile che le cellule tumorali ai bordi infiltrativi del tumore lo esprimano più intensamente. Pertanto dovrebbero essere analizzati compartimenti tissutali e popolazioni cellulari specifiche. Inoltre i livelli di PD-L1 sulla componente immune sono importanti per testare la risposta a certi farmaci anti PD1/PD-L1, poiché essa è legata ai livelli di espressione del PD-L1 stesso in tale componente. L'efficacia del trattamento anti-PD-L1 risiede nel rilascio di azioni immunologicamente inibitorie da parte dei linfociti citotossici antitumorali indotti dall'interazione tra PD-1, espresso sulle cellule immunitarie (in particolare linfociti) e PD-L1 espresso sulle cellule tumorali (Dorfman DM. et al, 2006; Juárez-Sacedo LM. et al, 2017).

Si è visto che generalmente una più elevata espressione di PD1 sembra essere il più efficace trattamento anti PD-L1. (Ile M. et Al, 2015).

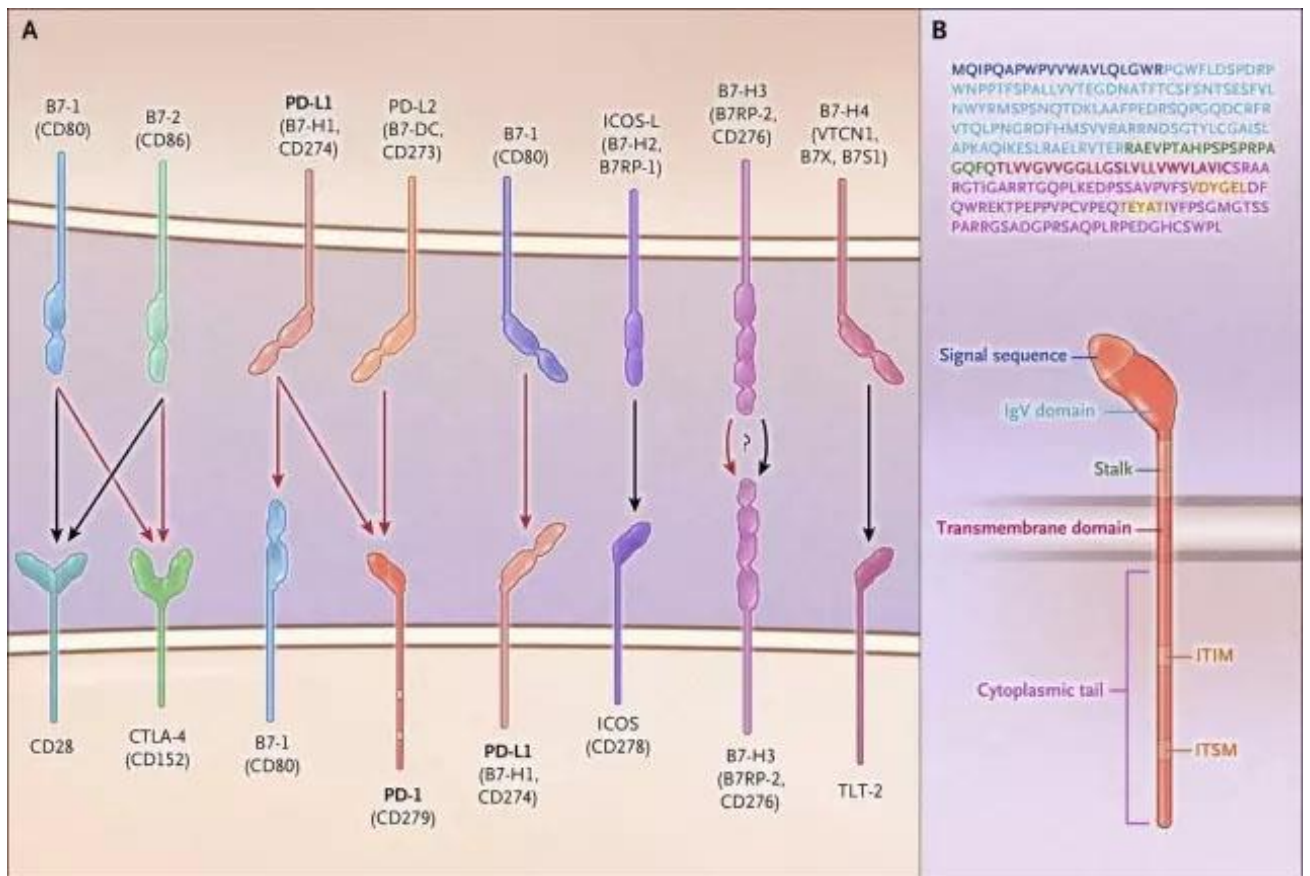


Fig. 2

A) Interazioni PD-L1 e PD-L2 con PD-1. (Le frecce rosse indicano un'azione inibitoria)

B) Struttura di PD-1:

Consiste in una singola regione immunoglobulinica N-terminale variabile IgV-like domain; un collo di 20 amminoacidi approssimativamente che separa il dominio IgV dalla membrana plasmatica; un dominio transmembrana; una coda citoplasmatica contenente catene amminoacidiche tirosiniche: immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) e immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM) (Vassiliki.A.Boussiotis et al, 2016).

4. MATERIALI E METODI

Al fine di soddisfare lo scopo della tesi sono stati selezionati 15 casi di linfoma DLBCL pervenuti presso il servizio di Anatomia Patologica dell' ULSS 17 da gennaio 2015 a luglio 2016, di cui 7 con fenotipo CD10 Pos, BCL6 Neg e MUM1 Neg (Germinal Cell B GCB), 8 con fenotipo CD 10 Neg, BCL6 Pos, MUM 1 Pos (non Germinal Cell B GCB).

Sui seguenti casi sono stati eseguiti indagini immunohistochimiche per il marcatore PD-L1.

Il VENTANA PD-L1 (SP236) è un anticorpo monoclonale primario di coniglio che si lega alla proteina PD-L1 in sezioni di tessuto fissate in formalina ed incluse in paraffina. L'anticorpo specifico può essere localizzato mediante un anticorpo secondario aptenato seguito da un coniugato HRP (Horseradish Peroxidase) anti-aptene multimerico (OptiView DAB IHC Detectin Kit.). Il complesso anticorpo-enzima specifico viene successivamente visualizzato con un precipitato del prodotto della reazione enzimatica. In aggiunta alla colorazione con VENTANA PD-L1 (SP236), è necessario colorare un secondo vetrino con Rabbit Monoclonal Negative Control Ig. Il controllo con reagente negativo viene usato per la valutazione della colorazione di fondo (DATA SHEET Roche, 2015).

4.1 METODICA IMMUNOISTOCHIMICA

L'immunohistochimica è una tecnica che riveste un ruolo molto importante nella routine del laboratorio di Anatomia Patologica, è in grado infatti di individuare specifiche molecole o strutture del compartimento intra ed extra cellulare. La tecnica immunohistochimica si basa sul principio di coniugazione antigene-anticorpo in addizione poi con sistemi di rivelazione (enzimatici, fluorescenti) che ne rendono visibile l'avvenuta reazione al microscopio.

Esistono metodiche dirette e indirette. Nelle metodiche dirette si utilizza un unico anticorpo diretto contro la molecola da ricercare e questo stesso anticorpo lega una sostanza colorata che ne permette la visualizzazione. Nelle metodiche indirette si utilizzano due anticorpi: il primo diretto contro la molecola da ricercare, il secondo, coniugato con la sostanza colorata, che si lega al primo

anticorpo. La molecola da ricercare nella sezione di tessuto in esame viene riconosciuta da un anticorpi prodotti da animali immunizzati contro quella molecola. Nelle metodiche indirette è necessario che il secondo anticorpo provenga da specie differenti da quella da cui è stato prodotto il primario perché altrimenti non sarebbe riconosciuto come antigene. In queste metodiche l'anticorpo primario diventa l'antigene che deve essere riconosciuto dall'anticorpo secondario. Oggi, al posto di anticorpi secondari, si utilizzano dei polimeri prodotti con tecniche di ingegneria che sono costituite da catene di zuccheri legati con anticorpi e coloranti contemporaneamente.

Nelle nostre indagini sono state allestite sezioni utilizzando vetrini carichi positivamente su cui sono state fatte aderire sezioni biotiche di 3 μ circa, e successivamente fatte asciugare 37° overnight.

Per questa indagine è stato utilizzato l'immunocoloratore automatico Bench Mark Ultra Ventana della ditta Roche; come sistema di rivelazione è stata utilizzata la DAB (Diaminobenzidina) che dà una colorazione marrone.

RUOLO PD-L1 NEL TARGETING OF PD-1

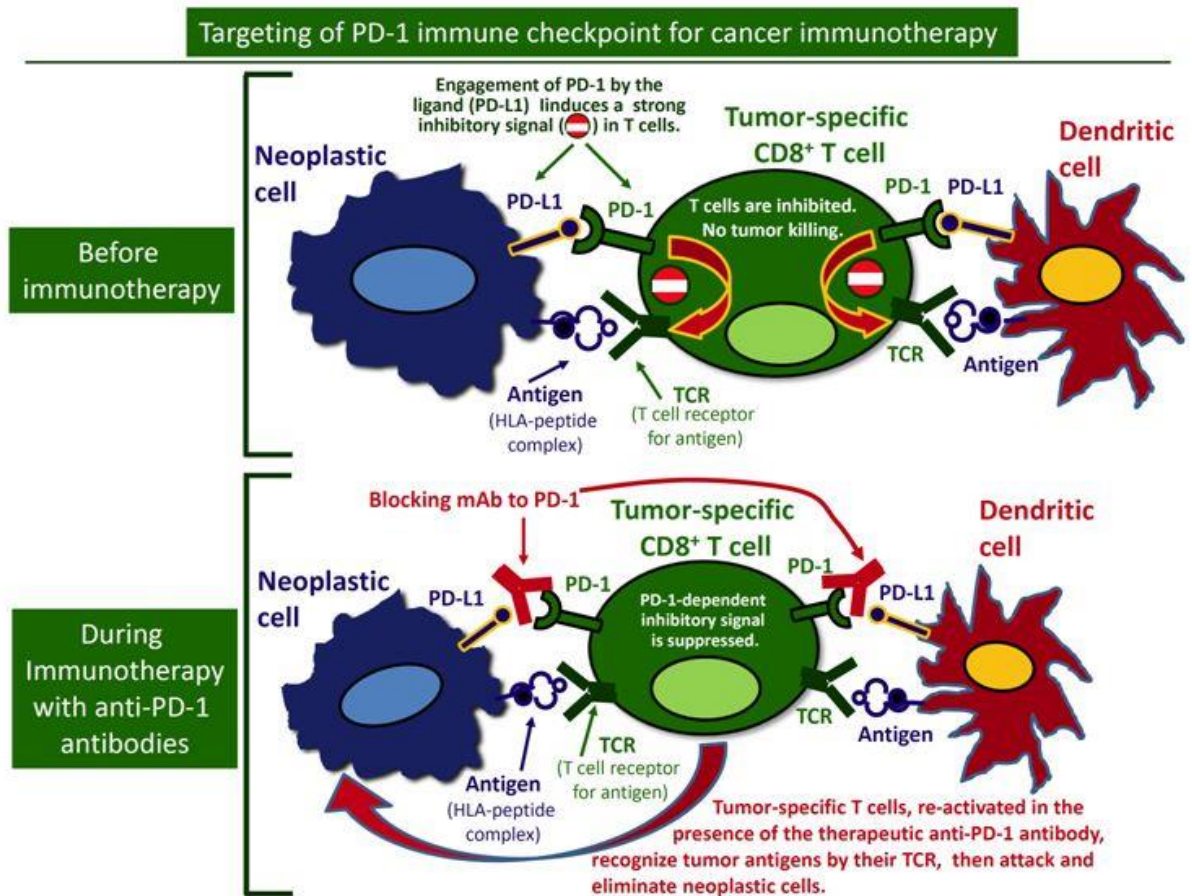


Fig. 3: gli anticorpi monoclonali specifici (mAb) agiscono a livello dei siti recettoriali di PD-1 e PD-L1 impedendone il legame. Viene così riconosciuto anche l'antigene presentato dalla cellula dendritica che attiva il linfocita T al riconoscimento e distruzione della cellula tumorale (Jelinek T. et al, 2017)

Recenti scoperte suggeriscono che una serie di variazioni strutturali nella parte che regola i livelli di espressione del gene PD-L1 conducono a una spiccata capacità cellulare di eludere il sistema immunitario, anche qualora sia attaccato da più linfociti T natural killer. La distruzione della regione 3'-UTR di PD-L1 produce una sovraespressione della proteina PD-L1 in molteplici istotipi cancerosi inclusa T-cell leukaemia e diffuse large B-cell lymphoma. Ciò suggerisce che tale mutabilità può essere sfruttata come marker genetico e diagnostico per pazienti che possono beneficiare della terapia anti-PD-1/PD-L1, in cui vi sia overespressione di PD-L1 e attiva evasione del sistema immunitario (Ktaoka K. et al, 2016; Ogawa S., 2107).

5. RISULTATI E ANALISI

Dei 15 casi esaminati si sono avuti i seguenti risultati:

CASI	PD-L1(%)	Istotipo
1	G = 10; g = 12	GCB
2	G = 50; g = 10	NON GCB
3	G = 80; g = 1	NON GCB
4	G = 5; g = 2	GCB
5	G = 10; g = 2	GCB
6	G = 70; g = 5	NON GCB
7	G = 50; g = 2	NON GCB
8	G = 10; g = 1	GCB
9	G = 20; g = 2	GCB
10	G = 20; g = 2	GCB
11	G = 40; g = 5	NON GCB
12	G = 10; G = 1	GCB
13	G = 30; g = 2	NON GCB
14	G = 30; g = 2	NON GCB
15	G = 5; g = 2	GCB

Tab. 2: Risultati

Otto casi esprimevano PD-L1 con una percentuale di cellule tumorali positive inferiore al 30%, mentre sette casi esprimevano una percentuale di PD-L1 nelle cellule tumorali variabile da 30% a 80%. Variabile dall'1% al 12% l'espressione di PD-L1 nel microambiente immune. La percentuale di espressione più alta di PD-L1 sono state evidenziate nel sottotipo NON GCB DLBCL (Tab.2).

5.1 DESCRIZIONE DEI CAMPIONI

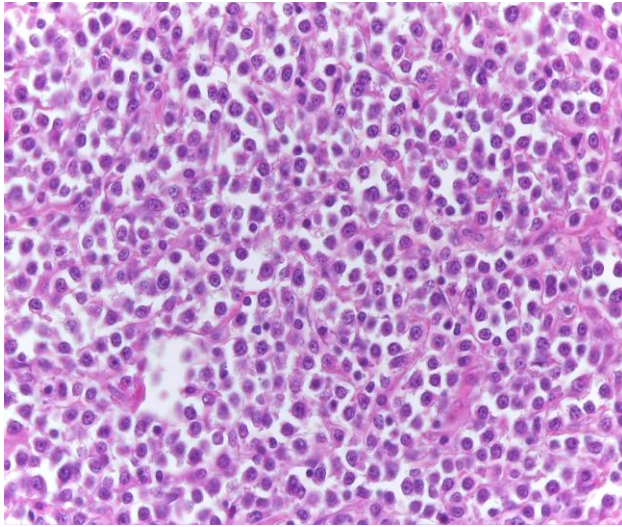
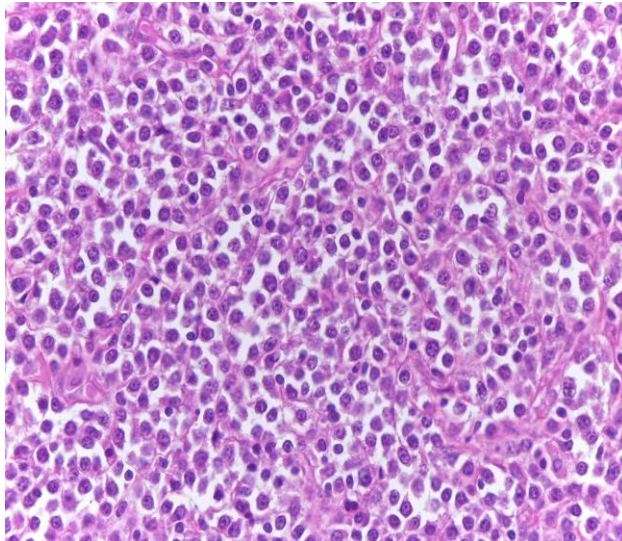


Fig. 4 e 5: Colorazione con Ematossilina ed Eosina (ingrandimento 20x)

Cellule di grossa taglia con nucleoli evidenti. Spicca il monomorfismo cellulare delle grandi cellule. Confrontando un linfocita (dimensioni circa 7 μm) si può notare la dimensione delle cellule circostanti



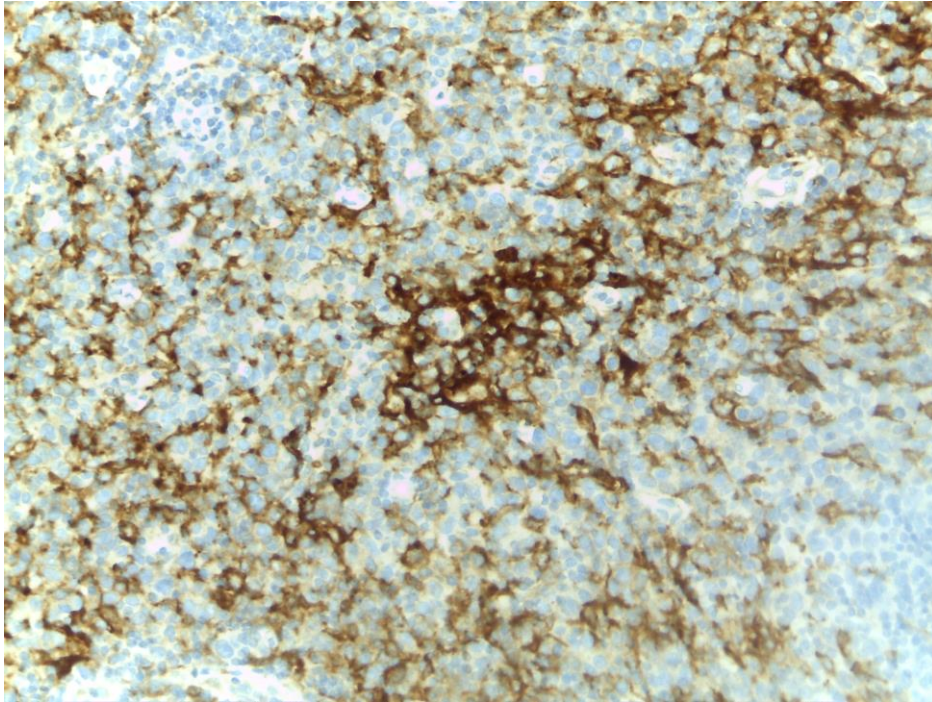


Fig 6: DLBCL, ICH per PD-L1 (ingrandimento 20x)

Si noti la positività baso-laterale delle cellule di grossa taglia

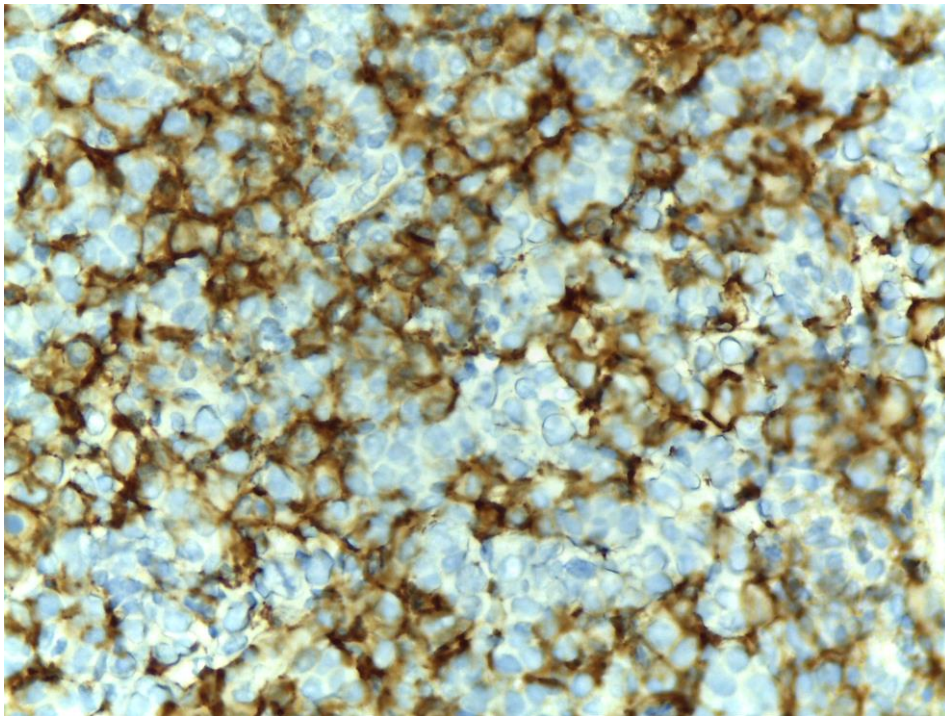


Fig. 7: DLBCL, ICH per PD-L1 (ingrandimento 40x)

Si noti la positività baso-laterale delle cellule di grossa taglia

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I nostri risultati sono in accordo con i dati riportati in letteratura. Tutti gli studi che hanno indagato i livelli di PD-L1 nel DLBCL hanno riportato percentuali più elevate di espressione nel sottotipo NON GCB DLBCL (Laurent C et al, 2015; Andorsky DJ et al, 2011; Chen BJ et al, 2013; Kiyasu et al, 2015). L'espressione di PD-L1 nel DLBCL ha un valore prognostico come confermato dallo studio di (Kiyasu et al, 2015) che utilizzando una larga serie di 1200 DLBCL dimostrava che i pazienti PD-L1 positivi avevano una sopravvivenza minore rispetto ai pazienti di PD-L1 negativi. Inoltre, la maggiore espressività del PD-L1 nelle cellule tumorali è stata quasi completamente assegnata al sottotipo NON GCB DLBCL che ha la prognosi peggiore dei sottotipi di DLBCL (Laurent C et al, 2015; Andorsky DJ et al, 2011; Kiyasu et al, 2015). Per i linfomi Non Hodgkin, di derivazione B linfocitaria, sono in corso diversi studi di fase I-II di combinazione, tesi a valutare l'efficacia degli anticorpi anti-PD-L1 con chemioterapia. Si è sicuramente all'inizio di nuova era per quanto riguarda la terapia dei linfomi dove uno degli obiettivi dei prossimi anni sarà quello di poter riuscire a trattare questi pazienti con una esclusiva terapia immunologica andando a ridurre rapidamente l'attuale ruolo della chemioterapia. Il nostro studio ha evidenziato, in accordo con i dati della letteratura, che il PD-L1 è iperespresso nel sottotipo NON GCB DLBCL. I pazienti con questo sottotipo di DLBCL potranno avvalersi dell'immunoterapia attiva con molecole che bloccando il PD-L1 attivano il sistema immunitario del paziente. La metodica immunoistochimica, essendo tecnica di routine in ogni laboratorio di anatomia patologica, permette di ottenere risultati dettagliati e quindi approcci terapeutici mirati.

7. BIBLIOGRAFIA

1. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma: the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997;89:3909-39;
2. AIOM linee guida Linfomi. Edizione 2013;
3. Andorsky DJ, Yamada RE, Said J., Pinkus GS., Betting DJ., Timmerman JM, Programmed death ligand 1 is expressed by non-hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T-cells, *Clin Cancer Res*, 2011
4. Bonadonna G. In: Bonadonna G, Robustelli della Cuna G, Valagussa P: *Medicina Oncologica*, Ottava Edizione. Elsevier Masson, Milano, 2007;
5. Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, Burek C, Ott G, Puig X, Yang L, Lopez-Guillermo A, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Gascoyne RD, Connors JM, Grogan TM, Braziel R, Fisher RI, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Simon R, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Montserrat E, Muller-Hermelink HK, Staudt LM, Campo E, Rosenwald A; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*. 2005;106:3183-90;
6. Boyer DF., McKelvie PA., De Leval L., Edlefsen KL., Ko YH., Aberman ZA., Kovach AE., Mash A., Nishino HT., Weiss LM., Meeker AK., Nardi V., Palisoc M., Shao L., Pittaluga S., Ferry JA., Harris NL., Shohani AR., Fibrin. Associated EBV-positive Large B-cell lymphoma: an indolent neoplasm with features distinct from diffuse large B-cell lymphoma associated with chronic inflammation, *Am. J. Surg Pathol*, 2017; 41(3): 299-312
7. Brown JA., Dorfman DM., Ma FR., Sullivan EL., Munoz O., Wood

- CR., Greenfield EA., Freeman GJ., Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production, *J. Immunol*, 2003; 170(3):1257-66;
8. Chen BJ., Chapuy B., Ouyang J., Sun HH., Roemer MG., Xu ML., Yu H., Fletcher CD., Freeman GJ., Shipp MA., Rodig SJ., PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies, *Clin cancer Res*, 2103;
 9. Chiappella A., Rossi D., Vitolo U., Linfomi non Hodgkin a grandi cellule, *Ematologia Oncologica*, 2011, 8(1), pag. 17-19;
 10. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F, Colomer D, Falini Brunangelo, Montserrat E, Campo E. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003;101:78-84;
 11. Dorfman DM., Brown JA., Shahsafaei A., Freeman GJ., Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal centre associated T cell angioimmunoblastic T-cell lymphoma, *Am J Surg Pathol*, 2006; 3: 802-810;
 12. ES Jaffe, NL Harris, H Stein, JW Vardiman. Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. WHO 2001;
 13. Fingazio M, Rasi S., Brusca A., Rossi D., Gaidano G., Meccanismi Patogenetici, *Ematologia Oncologica*, 2011; 8(1): 5-13
 14. Gong Y., Chen R., Zhang X., Zou ZM., Chen XH, Role of immune microenvironmental factors for improving the IPI-related risk stratification of aggressive B cell Lymphoma, *Biomed Environ Sci*, 2017; 38(7): 492-500;
 15. Jelinek T., Mihalova J., Kascak M., Duras J., Hajek R., PD-1/PD-L1 inhibitors in hematological malignancies: update 2017, *Immunology*, 2017; 152: 357-371;

16. Juárez-Sacedo LM., Sandoval-Sus J., Sokoi L., Chavez JC., Dalia S, The role of anti-PD-1 and anti-PD-L1 agents in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma: The future is now, *Crit Rev Oncol Hemtol*, 2017;113: 52-62;
17. Vassiliki A. Boussiotis, M.D., Ph.D., Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway, *N.Engl J Med*, 2016; 375(18); 1767-1778;
18. Kataoka K., Shiraishi Y., Takeda Y., Sakata S., Matsumoto M., Nagano, Takuya Maeda S., Nagata Y., Kitanaka A., Mizuno S., Tanaka H., Chiba K., Ito S., Watatani Y., Kakiuchi N., Suzuki H., Yoshizato T., Yoshida K., Sanada M., Itonaga H., Imaizumi Y., Totoki Y., Munakata W., Nakamura H., Hama N., Shide K., Kubuki Y., Hidaka T., Kameda T., Masuda K., Minato N., Kashiwase K., Izutsu K., Takaori-Kondo A., Miyazaki Y., Takahashi S., Shibata T., Kawamoto H., Akatsuka Y., Shimoda K., Takeuchi K., Seya T., Miyano S. & Ogawa S., Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers, *Nature*, 2016; 534, 402–406;
19. Kiyasu J., Miyoshi H., Hirata A., Arakawa F., Ichikawa A., Niino D., Sugita Y., Yufu Y., Choi I., Abe Y., Uike N., Nagafujii K., Okamura T., et Al, Exspression of programmed cell death ligandi 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma, *Blood*, 2015;
20. Laurent C., Champi K., Gravelle P., Tsolini M., Franchet C., Ysebaert L., Bousset P., Bidaut A., Ycart B., Fournié JJ., Several immune escape patterns in non –Hodgkin’s lymphomas, *OncoImmunology*, 2015, 4;
21. Ogawa S., Novel mechanism of immune evasion in cancer via structural variations of the PD-L1 gene, *Rinsho Ketsueki*, 2017;58(8):957-965;

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio di cuore il laboratorio di anatomia patologica dell'azienda ospedaliera ULSS 6 di Schiavonia, tutti i collaboratori che mi hanno sostenuta nel lavoro di tirocinio ed elaborazione della tesi, tra impegni di lavoro, momenti di gioia e di dolore. Ringrazio in particolare il Chiar.mo dottor Angelo Farruggio e dottoressa Natalina Antonella Marchi che si sono occupati della buona riuscita del lavoro dimostrando la loro professionalità.

Una ringraziamento va al professor Cesare Montecucco che si è prestato come tutor, alla professoressa Ornella Rossetto e a tutti i professori dell'università di Padova per la loro dedizione all'insegnamento.

Desidero ringraziare anche i miei genitori e la famiglia per non aver smesso di credere nelle mie capacità nonostante la strada non sia stata tutta in salita in questi tre anni, rispetto agli anni scolastici precedenti, e nel spronare una già testarda di per sè a non arrendersi comunque alle prime difficoltà.

Approfitto dell'occasione per ringraziare anche gli amici e i compagni di corso per tutte le avventure passate insieme.