



UNIVERSITÀ DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Oncologiche e Gastroenterologiche (DISCOG)

Direttore: Prof. Umberto Cillo

UOC Oncologia 2, Istituto Oncologico Veneto (IRCCS)

Direttrice: Prof.ssa Valentina Guarneri

Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina e Chirurgia

TESI DI LAUREA

Valutazione del ruolo prognostico delle citochine infiammatorie nel TNBC: un'analisi traslazionale del trial A-BRAVE

Relatore: prof.ssa Maria Vittoria Dieci

Correlatore: dott. Davide Massa

Laureando: Filippo Da Re

n. matricola: 2020493

Anno Accademico: 2025-2026

Indice

Riassunto	1
Abstract	3
Introduzione	5
1.1 Epidemiologia del carcinoma mammario triplo negativo	5
1.2 L'immunogenicità e l'eterogeneità del TNBC	6
1.3 Trattamento del carcinoma mammario triplo negativo in stadio precoce (early-stage TNBC)	7
1.3.1 Il perfezionamento della chemioterapia neoadiuvante	8
1.3.2 Chemioimmunoterapia neoadiuvante: standard of care per TNBC in stadio II-III 9	9
1.3.3 Chemioterapia e checkpoint inibitori nella fase adiuvante nel TNBC	11
1.4 Biomarcatori immunitari e loro ruolo nel TNBC precoce	12
1.4.1 TILs	12
1.4.2 PD-L1	14
1.4.3 Biomarcatori prognostici circolanti: le citochine	15
1.5 Scopo della tesi	23
Materiali e metodi	24
2.1 Disegno dello studio A-BRAVE e timing di raccolta dei campioni biologici 24	24
2.2 Metodologia di analisi dei campioni	25
2.2.1 Processazione ed analisi dei campioni	25
2.2.2 Quantificazione multiplex delle citochine	25
2.3 Analisi statistica	33
Risultati	35
3.1 Caratteristiche della popolazione	35
3.2 Associazioni tra citochine e parametri clinico-patologici	36
3.3 Citochine e ruolo prognostico	47
Discussione	51
Conclusioni	56
Bibliografia	57

Riassunto

Introduzione: il carcinoma mammario triplo negativo (TNBC) è una neoplasia aggressiva ed estremamente eterogenea, ma contraddistinta da una spiccata immunogenicità. In questo scenario, le citochine plasmatiche circolanti si delineano come promettenti biomarcatori dinamici e facilmente accessibili, in grado di riflettere lo stato del microambiente tumorale e di supportare la stratificazione prognostica dei pazienti.

Obiettivo: valutare il significato prognostico dei livelli plasmatici di un ampio pannello di citochine in pazienti affette da TNBC in stadio precoce ad alto rischio, utilizzando i campioni biologici raccolti prospetticamente nell'ambito del trial multicentrico randomizzato di fase III A-BRAVE.

Materiali e metodi: sono stati analizzati i campioni plasmatici basali di 322 pazienti, corrispondenti al 69,1% della popolazione complessiva dello studio. Le concentrazioni di 47 citochine, chemochine e fattori di crescita sono state determinate mediante tecnologia multiplex Luminex xMAP. Le associazioni con le caratteristiche clinico-patologiche sono state investigate mediante test statistici non parametrici (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e correlazione di Spearman), mentre il valore prognostico rispetto agli outcome [sopravvivenza libera da recidiva a distanza (DDFS) e alla sopravvivenza globale (OS)] è stato valutato mediante modelli di regressione di Cox, con correzione per confronti multipli.

Risultati: il profilo citochinico ha mostrato correlazioni significative con diverse caratteristiche delle pazienti: Eotassina, IP-10 e MIG sono risultate positivamente correlate con l'età; IL-6 e VEGF-A hanno mostrato livelli significativamente più elevati nelle pazienti sovrappeso o obese; lo stadio tumorale è emerso come la variabile maggiormente impattante, correlando con l'incremento di otto analiti (IL-9, IL-13, IL-5, IL-10, MIG, Fractalkine, IL-22, TNF α) nei contesti più avanzati. All'analisi di Cox univariabile, livelli crescenti di IL-3 (HR = 1.42, 95%CI 1.01-2.01, p = 0.043), IL-22 (HR = 1.15, 95%CI 1.01-1.31, p = 0.032), MIP-1 β (HR = 1.13, 95%CI 1.01-1.25, p = 0.028) e FTL-3L (HR = 1.18, 95%CI 1.05-1.32, p = 0.006) sono stati associati ad una ridotta DDFS. Inoltre, incrementi di FTL-3L hanno predetto una OS inferiore (HR = 1.17, 95%CI 1.02-1.35, p = 0.021), mentre l'IL-12p40 ha mostrato un effetto protettivo associandosi a una riduzione

del rischio di morte (HR = 0.82, 95%CI 0.69-0.97, $p = 0.023$). All'analisi di Cox multivariabile FTL-3L ha confermato l'effetto presente nell'analisi univariabile per la DDFS (HR = 1.15, 95%CI 1.004-1.33, $p = 0.044$), ma non per la OS ($p = 0.062$); IL-22 è rimasta significativa in termini di DDFS (HR = 1.19, 95%CI 1.01-1.39, $p = 0.036$) e ha acquisito significato prognostico negativo in termini di OS (HR = 1.22, 95%CI 1.01-1.47, $p = 0.04$); MIP-1 β è risultato al limite della significatività in termini di DDFS ($p = 0.05$) ma ha acquisito un significato prognostico negativo in OS (HR = 1.16, 95%CI 1.01-1.34, $p = 0.038$); IL-3 è risultata non significativa per DDFS dopo correzione ($p = 0.064$); IL-12p40 ha mantenuto l'effetto protettivo sulla sopravvivenza presente all'analisi univariabile (HR = 0.81, 95%CI 0.67-0.98, $p = 0.032$).

Conclusioni: abbiamo identificato come alcune citochine plasmatiche siano potenziali biomarcatori prognostici nel TNBC precoce ad alto rischio. Questi risultati hanno carattere esplorativo e richiederanno una validazione in coorti indipendenti.

Abstract

Introduction: Triple-negative breast cancer (TNBC) is an aggressive and highly heterogeneous malignancy, yet it is characterized by distinct immunogenicity. In this scenario, circulating plasma cytokines emerge as promising, easily accessible dynamic biomarkers capable of reflecting the state of the tumor microenvironment and supporting patient prognostic stratification.

Objective: to evaluate the prognostic significance of plasma levels from a broad panel of cytokines in patients with high-risk early-stage TNBC, utilizing biological samples prospectively collected within the phase III randomized multicenter A-BRAVE trial.

Materials and methods: baseline plasma samples from 322 patients, corresponding to 69.1% of the total study population, were analyzed. Concentrations of 47 cytokines, chemokines, and growth factors were determined using Luminex xMAP multiplex technology. Associations with clinicopathological features were investigated using non-parametric statistical tests (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, and Spearman correlation). Prognostic value regarding outcomes [distant disease-free survival (DDFS) and overall survival (OS)] was evaluated using Cox regression models, with correction for multiple comparisons.

Results: the cytokine profile showed significant correlations with several patient characteristics. Eotaxin, IP-10, and MIG were positively correlated with age. IL-6 and VEGF-A showed significantly higher levels in overweight or obese patients. Tumor stage emerged as the most impactful variable, correlating with an increase in eight analytes (IL-9, IL-13, IL-5, IL-10, MIG, Fractalkine, IL-22, TNF α) in more advanced settings. In the univariate Cox analysis, increasing levels of IL-3 (HR = 1.42, 95% CI 1.01-2.01, p = 0.043), IL-22 (HR = 1.15, 95% CI 1.01-1.31, p = 0.032), MIP-1 β (HR = 1.13, 95% CI 1.01-1.25, p = 0.028), and FLT-3L (HR = 1.18, 95% CI 1.05-1.32, p = 0.006) were associated with reduced DDFS. Moreover, increases in FLT-3L predicted inferior OS (HR = 1.17, 95% CI 1.02-1.35, p = 0.021), while IL-12p40 showed a protective effect, being associated with a reduced risk of death (HR = 0.82, 95% CI 0.69-0.97, p = 0.023). In the multivariate Cox analysis FLT-3L confirmed the effect observed in the univariate analysis for DDFS (HR = 1.15, 95% CI 1.004-1.33, p = 0.044), but not for OS (p = 0.062); IL-22

remained significant for DDFS (HR = 1.19, 95% CI 1.01-1.39, $p = 0.036$) and acquired a negative prognostic significance for OS (HR = 1.22, 95% CI 1.01-1.47, $p = 0.04$); MIP-1 β was borderline significant for DDFS ($p = 0.05$) but acquired a negative prognostic significance for OS (HR = 1.16, 95% CI 1.01-1.34, $p = 0.038$); IL-3 became non-significant for DDFS after correction ($p = 0.064$); IL-12p40 maintained the protective effect on survival observed in the univariate analysis (HR = 0.81, 95% CI 0.67-0.98, $p = 0.032$).

Conclusions: we identified that certain plasma cytokines are potential prognostic biomarkers in high-risk early-stage TNBC. These findings are exploratory and will require validation in independent cohorts.

Introduzione

1.1 Epidemiologia del carcinoma mammario triplo negativo

Il carcinoma mammario è il secondo tumore più diagnosticato al mondo, rappresentando l'11,6% di tutti i nuovi casi di cancro nel 2022. Tra la popolazione femminile, il carcinoma mammario risulta essere la principale causa di cancro e di mortalità correlata ad esso a livello globale¹. Anche in Italia il carcinoma mammario è la principale neoplasia diagnosticata nelle donne².

Il carcinoma mammario è una neoplasia estremamente eterogenea classificata in almeno 3 sottotipi sulla base dello stato dell'espressione del recettore degli estrogeni (ER) e del recettore del progesterone (PGR) e sulla base dell'overespressione/amplificazione del recettore tirosinchinasico HER2 (codificato da ERBB2). I carcinomi mammari che esprimono ER e/o PGR sono definiti carcinomi mammari a recettori ormonali positivi (HR+), quelli con sovraespressione di HER2 (o amplificazione di ERBB2) come carcinomi mammari HER2+, e quelli che non esprimono né ER né PGR né HER2 come carcinomi mammari triplo negativi (TNBC)³.

In termini di prevalenza la malattia HR+ rappresenta la maggioranza dei casi (60–75%), mentre la malattia HER2+ e il TNBC rappresentano ciascuno circa il 10–15% dei casi⁴. Il TNBC è quello che si associa alla prognosi peggiore tra tutti i sottotipi di carcinoma mammario⁵. Mentre per la malattia HR+ e HER2+ sono a disposizione, oltre alla chemioterapia, terapie efficaci a bersaglio molecolare (come terapia ormonale, terapie anti-HER2, inibitori CDK4/6) che hanno ridotto progressivamente la mortalità, ad oggi il TNBC rappresenta ancora una malattia aggressiva con poca disponibilità di terapie efficaci ed una prognosi infausta⁵ (**Figura 1**).

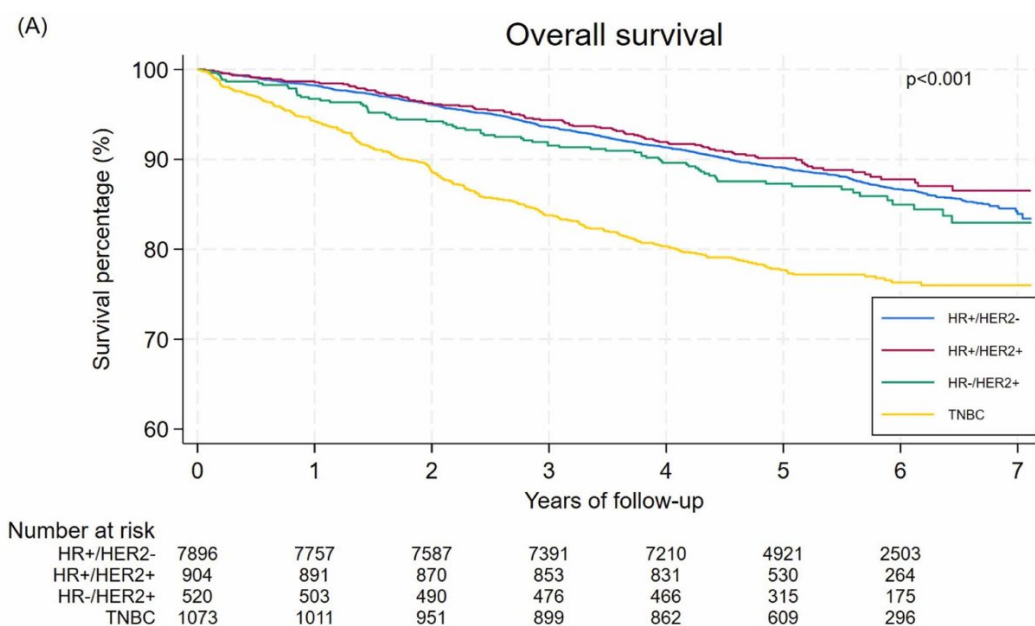


Figura 1: curva di sopravvivenza Kaplan-Meier della sopravvivenza globale (overall survival) in base al sottotipo di carcinoma mammario. Ref. ⁵

1.2 L'immunogenicità e l'eterogeneità del TNBC

Un microambiente tumorale (TME) immunologicamente "caldo" si associa generalmente ad un elevato carico mutazionale tumorale (TMB) e dunque ad una maggiore probabilità che le cellule maligne esprimano neoantigeni tumorali (TNA) riconoscibili dai linfociti T citotossici (CTL), nonché a una maggiore espressione del Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) come conseguenza dell'attività dei CTL^{6,7}.

Nel carcinoma mammario sia lo sviluppo che la progressione sono influenzati dalle interazioni con il sistema immunitario, ma il suo profilo immunologico è maggiormente eterogeneo rispetto a quello dei tumori più tipicamente "caldi" come il melanoma, il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) e il carcinoma coloretale con instabilità dei microsattelliti, o dei tipi di cancro generalmente "freddi" come il glioblastoma, il cancro ovarico e il cancro alla prostata⁸. Infatti, la configurazione immunologica del carcinoma mammario dipende fortemente dal sottotipo di malattia^{9,10}.

Il TNBC è il sottotipo più immunogenico di carcinoma mammario (**Tabella I**). A differenza dei sottotipi HR+ e HER2+, il TNBC è caratterizzato da un'elevata instabilità genomica, un elevato TMB, un frequente deficit di ricombinazione

omologa (HRD) e dalla mutagenesi mediata da APOBEC; tutti fattori che convergono nel generare un ricco panorama di neoantigeni tumore-specifici^{11,12}. Per questi motivi il TNBC è caratterizzato da un abbondante infiltrazione di cellule immunitarie nel microambiente tumorale, in particolare linfociti infiltranti il tumore (TILs), e da un'elevata espressione di PD-L1¹⁰.

Queste caratteristiche hanno posto il razionale per ricercare se l'immunoterapia potesse essere una soluzione valida nel trattamento del TNBC e se la caratterizzazione del microambiente tumorale potesse avere un impatto prognostico/predittivo.

Class	Feature	Breast cancer subtype		
		HR ⁺ HER2 ⁻	HER2 ⁺	TNBC
Antigenicity	Tumour mutational burden	—	+	++
	Tumour neoantigens	—	+	++
	HLA expression levels	+/-	+	++
Immune infiltration	Tumour-infiltrating lymphocytes	+/-	+	+++
	Effector T cells	+/-	+	+++
	Regulatory T cells	+/-	+	+++
	B cells	+/-	+	+++
	Natural killer cells	+/-	+++	+++
	Tumour-associated macrophages	++	+++	+++
	Dendritic cells	+/-	+	++
Immunomodulation	PDL1 expression	—	+	++

HR⁺, hormone receptor-positive; TNBC, triple-negative breast cancer.

Tabella I: caratteristiche immunologiche del microambiente tumorale nei diversi sottotipi di carcinoma mammario. Ref.⁸

1.3 Trattamento del carcinoma mammario triplo negativo in stadio precoce (early-stage TNBC)

Il TNBC è una neoplasia che per definizione, a differenza degli altri sottotipi molecolari, non presenta bersagli terapeutici, per cui il suo trattamento si è storicamente basato sulla chemioterapia citotossica.

Per decenni, il fulcro della terapia sistemica per l'early-stage TNBC è stato costituito da regimi sequenziali a base di antracicline e taxani¹³. Il regime dose-dense con doxorubicina/ciclofosfamida (AC) seguito da paclitaxel è diventato uno standard ampiamente adottato¹³. La risposta a questo regime di trattamento è stata dimostrata essere un importante fattore prognostico per modulare la terapia adiuvante nei pazienti ad alto rischio: infatti pazienti con una risposta patologica completa (pCR) rispetto ai pazienti con malattia residua (RD) presentano sia una sopravvivenza globale che una sopravvivenza libera da eventi maggiore di circa il

51%¹⁴. Tuttavia, sebbene la chemioterapia neoadiuvante abbia una buona efficacia nel prevenire le recidive di malattia, i pazienti che non rispondono sono a rischio molto elevato di progressione e di morte¹⁵⁻¹⁷.

Per migliorare la risposta dei pazienti alla chemioterapia neoadiuvante sono state intraprese diverse strade.

1.3.1 Il perfezionamento della chemioterapia neoadiuvante

L'aggiunta di agenti a base di platino alla chemioterapia neoadiuvante ha rappresentato un progresso importante. Tre grandi studi randomizzati (GeparSixto, CALGB 40603 e BrighTNess) hanno dimostrato un aumento dei tassi di pCR con l'aggiunta di carboplatino ai regimi cardine con antracicline e tassani¹⁸⁻²¹. Considerato il forte valore prognostico della pCR nel TNBC, questi risultati hanno gettato le basi per l'integrazione del platino nei regimi neoadiuvanti standard e, in ultima analisi, nel background chemioterapico utilizzato in associazione all'immunoterapia. In aggiunta, hanno portato allo sviluppo di strategie di intensificazione della chemioterapia per quei pazienti con residuo di malattia dopo terapie neoadiuvante. Ad esempio, lo studio di fase III randomizzato CREATE-X²² ha randomizzato 910 pazienti con carcinoma mammario invasivo residuo HER2-negativo dopo chemioterapia neoadiuvante (contenente antracicline, tassani o entrambi) a ricevere capecitabina adiuvante o il trattamento post-chirurgico standard a base di antracicline e tassani²². Tra le pazienti con TNBC, capecitabina ha migliorato significativamente la DFS a 5 anni (69,8% vs 56,1%; HR 0.58) e la OS (78,8% vs 70,3%; HR 0.52)²². Per le pazienti portatrici di varianti patogenetiche germinali di BRCA1/2, lo studio OlympiA ha permesso di includere i PARP inibitori in adiuvante in pazienti ad alto rischio operate upfront o dopo trattamento neoadiuvante²³. Questo studio di fase III ha randomizzato 1.836 pazienti con carcinoma mammario precoce HER2-negativo ad alto rischio e varianti germinali di BRCA1/2 a ricevere 1 anno di olaparib o placebo dopo il completamento della chemioterapia (neo)adiuvante e del trattamento locale²³. Ad un follow-up mediano di 2,5 anni, olaparib ha migliorato significativamente la iDFS a 3 anni (85,9% vs 77,1%; HR 0,58; $P < 0,001$) e la DDFS (87,5% vs 80,4%; HR 0,57; $P < 0,001$); a 3,5 anni di follow-up mediano ha dimostrato un beneficio significativo in termini di OS (OS a 4 anni: 89,8% vs 86,4%; HR 0,68; $P = 0,009$)^{23,24}.

Con la consapevolezza che il TNBC presenti livelli più elevati di linfociti infiltranti il tumore (TILs) e di espressione di PD-L1 rispetto ad altri sottotipi di carcinoma mammario, è stata fornita la base biologica per l'inibizione dei checkpoint immunitari²⁵. Sulla base dei risultati ottenuti nel setting metastatico, in cui la combinazione di chemioterapia e inibitori dei checkpoint immunitari ha dimostrato un miglioramento degli outcome clinici nei pazienti con TNBC PD-L1-positivo, diversi studi di fase II e III hanno valutato l'aggiunta di inibitori di PD-1/PD-L1 alla chemioterapia neoadiuvante nel TNBC in stadio precoce^{26–28}.

1.3.2 Chemioimmunoterapia neoadiuvante: standard of care per TNBC in stadio II-III

Il trial KEYNOTE-522 ha stabilito l'attuale standard di cura per il TNBC in stadio II-III (**Figura 2**)²⁹.

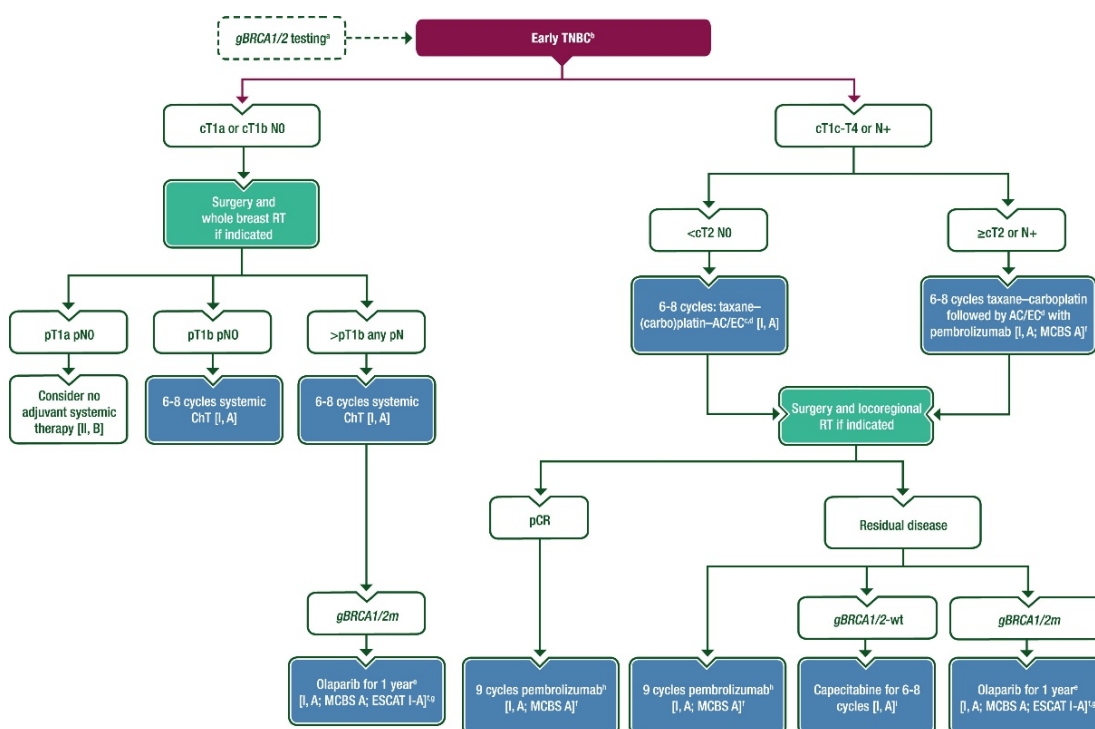


Figura 2: algoritmo di trattamento secondo le linee guida ESMO del early-stage TNBC. Ref. ³⁰

Questo studio cardine ha randomizzato 1.174 pazienti con TNBC in stadio II o III non precedentemente trattato, con un rapporto 2:1, a ricevere come terapia neoadiuvante pembrolizumab (200 mg ogni 3 settimane) o placebo in combinazione con paclitaxel/carboplatin per 4 cicli, seguito da pembrolizumab o placebo più doxorubicina-ciclofosfamide o epirubicina-ciclofosfamide per 4 cicli²⁹. Dopo l'intervallo chirurgico definitivo, le pazienti hanno ricevuto pembrolizumab

adiuvante o placebo per un massimo di 9 cicli. Lo studio ha soddisfatto entrambi i co-endpoint primari: pCR (64,8% vs 51,2%; $p < 0.001$) e sopravvivenza libera da eventi (EFS; a 36 mesi: 84,5% vs 76,8%; HR 0.63; $p < 0.001$)³¹. L'analisi finale della sopravvivenza globale, riportata dopo un follow-up mediano di 93,8 mesi, ha dimostrato un miglioramento statisticamente significativo nella OS a 7 anni (85,1% vs 77,2%; $p = 0.002$)³². Tale beneficio è stato osservato in tutti i sottogruppi prespecificati, includendo sia i tumori PD-L1-positivi sia quelli PD-L1-negativi. Da luglio 2021 la FDA ha approvato pembrolizumab in combinazione con la chemioterapia per il trattamento neoadiuvante e come singolo agente per il trattamento adiuvante del TNBC ad alto rischio in stadio precoce³³. Le linee guida raccomandano ora carboplatino/paclitaxel più pembrolizumab seguito da ciclofosfamide/doxorubicina (o epirubicina) più pembrolizumab come regime neoadiuvante preferito per il TNBC in stadio II–III, seguito da pembrolizumab adiuvante³⁰.

Lo studio di fase II GeparNuevo ha randomizzato 174 pazienti con TNBC in stadio precoce a ricevere durvalumab (anti-PD-L1) o placebo in aggiunta a nab-paclitaxel seguito da epirubicina/ciclofosfamide. Il tasso di pCR è risultato numericamente superiore con durvalumab (53,4% vs 44,2%; $p = 0.287$), con un beneficio significativo osservato nella coorte della fase "finestra" (window-phase) che aveva ricevuto durvalumab in monoterapia prima dell'inizio della chemioterapia (pCR 61,0% vs 41,4%; $p = 0.035$)³⁴. Sorprendentemente, il follow-up a lungo termine a un valore mediano di 86,4 mesi ha dimostrato miglioramenti duraturi e significativi nella sopravvivenza libera da malattia invasiva (iDFS; HR 0.56), nella sopravvivenza libera da metastasi a distanza (DDFS; HR 0.41) e nella sopravvivenza globale (OS; HR 0.33; $p = 0.009$), senza la prosecuzione dell'inibizione dei checkpoint in fase adiuvante³⁵. Questi risultati hanno sollevato l'interessante interrogativo se un'immunoterapia esclusivamente neoadiuvante possa essere sufficiente in popolazioni selezionate.

Lo studio di fase III IMpassion031 ha randomizzato 333 pazienti con TNBC in stadio II–III a ricevere atezolizumab neoadiuvante (anti-PD-L1) o placebo in combinazione con nab-paclitaxel seguito da doxorubicina/ciclofosfamide. Atezolizumab ha migliorato significativamente i tassi di pCR (58% vs 41%; $p = 0.004$), indipendentemente dallo stato di PD-L1³⁶. L'analisi finale a 3 anni di follow-

up, tuttavia, ha mostrato esiti a lungo termine numericamente favorevoli nel gruppo atezolizumab (EFS HR 0.76; OS HR 0.56), sebbene i risultati non fossero statisticamente significativi³⁷.

1.3.3 Chemioterapia e checkpoint inibitori nella fase adiuvante nel TNBC

Lo studio A-BRAVE, oggetto del presente elaborato, ha affrontato un quesito distinto e clinicamente importante: se l'inibizione adiuvante dei checkpoint immunitari potesse migliorare gli esiti clinici in pazienti con TNBC precoce ad alto rischio che avevano già completato la chirurgia standard e la chemioterapia (neo)adiuvante³⁸. A-BRAVE è uno studio di fase III, randomizzato, in aperto, che ha arruolato pazienti con TNBC precoce ad alto rischio, assegnandole a 1 anno di avelumab adiuvante rispetto alla sola osservazione. L'alto rischio era definito da due strati:

- i. Strato A (n = 83, 18%): pazienti sottoposte a chirurgia primaria con caratteristiche patologiche ad alto rischio ($\geq$ pN2/qualsiasi pT, pN1/pT2 o pN0/pT3);
- ii. Strato B (n = 383, 82%): pazienti con malattia invasiva residua (mammaria e/o linfonodale) dopo chemioterapia neoadiuvante.

I co-endpoint primari erano la sopravvivenza libera da malattia (DFS) nella popolazione intention-to-treat (ITT) e nello Strato B. Gli endpoint secondari includevano la sopravvivenza globale (OS) e la DFS nelle pazienti PD-L1-positive.

Tra giugno 2016 e ottobre 2020 sono state randomizzate 466 pazienti. A un follow-up mediano di 52,1 mesi, lo studio non ha soddisfatto i suoi co-endpoint primari: nella popolazione ITT la DFS ha mostrato un miglioramento non statisticamente significativo con avelumab (HR 0.81, 95%CI 0.61–1.09, $p = 0.172$) con stime a 3 anni del 68,3% per avelumab rispetto al 63,2% per l'osservazione; allo stesso modo, nello Strato B la DFS ha mostrato miglioramenti non statisticamente significativi (HR 0.80, 95%CI 0.58–1.10, $p = 0.17$) con stime 3 anni del 66,9% rispetto al 60,7%. Ciononostante, un'analisi descrittiva della OS ha rivelato che avelumab ha ridotto il rischio di morte (HR 0.66, 95%CI 0.45–0.97), con stime di OS a 3 anni dell'84,8% rispetto al 76,3% e migliorato i tassi di distant

DFS (DDFS) a 3 anni del 75.4% rispetto al 67.9% (HR 0.70, 95%CI 0.50-0.96), ora riconosciuto come uno dei migliori endpoint surrogati di OS nel setting precoce.

Lo studio A-BRAVE, che ha arruolato prevalentemente pazienti esposte a chemioterapia neoadiuvante che non avessero ottenuto una pCR, pur non impattando ad oggi sulla pratica clinica, suggerisce la possibilità di personalizzare l'immunoterapia offrendola potenzialmente solo pazienti selezionate ad alto rischio e non a tutte le pazienti candidate a chemioterapia neoadiuvante, permettendo quindi di ridurre il rischio di tossicità legata all'uso di questi farmaci^{32,38}. Tale ipotesi esploratoria è attualmente valutata da un ampio studio americano, SWOG S1418, con un disegno di studio simile allo studio A-BRAVE, attualmente in corso³⁹.

1.4 Biomarcatori immunitari e loro ruolo nel TNBC precoce

L'avvento dell'immunoterapia e la maggiore conoscenza dell'importanza del microambiente tumorale nel TNBC hanno aperto le porte alla ricerca sul ruolo prognostico e potenzialmente predittivo dei biomarcatori immunitari.

1.4.1 TILs

Il primo biomarcatore ad essere stato studiato è costituito dai linfociti infiltranti il tumore (TILs). I TILs sono cellule mononucleate (linfociti, plasmacellule, monociti e cellule NK-T) disperse nello stroma tumorale (stromal TILs, sTILs) o localizzate all'interno del tumore stesso (intratumoral TILs, iTILs)⁴⁰⁻⁴². Dal punto di vista fenotipico, i TILs possono essere classificati in linfociti T CD8+ citotossici, CD4+ T helper, CD4+ T regolatori (Treg), CD4+ T follicolare e linfociti B tumore-infiltranti; tuttavia, il ruolo clinico specifico di ciascuna sottopopolazione rimane ancora oggetto di studio⁴¹⁻⁴³. Secondo le raccomandazioni dell'International TILs Working Group, la valutazione patologica standard prevede la quantificazione dei soli sTILs su sezioni colorate con ematossilina-eosina, calcolando il rapporto tra l'area stromale intratumorale contenente linfociti e plasmacellule e l'area stromale intratumorale totale⁴⁴.

Ad oggi vi sono molte evidenze sul fatto che i TILs abbiano un ruolo prognostico nel TNBC⁴⁵. Valori più elevati di TILs all'interno del microambiente

tumorale del TNBC correlano con una maggior sopravvivenza sia nel setting adiuvante che neoadiuvante^{41,44,46-49}. Diversi studi hanno dimostrato che livelli più elevati di TILs nella biopsia diagnostica si associano a un incremento della pCR con la chemioterapia neoadiuvante, nonché a una maggiore sopravvivenza libera da eventi e sopravvivenza globale nei sottotipi più aggressivi^{47,50-52}. È stato inoltre osservato che l'incremento dei TILs nella malattia residua al termine dei cicli di chemioterapia neoadiuvante si associa a una prognosi migliore, e potrebbe essere considerato un marcatore di efficacia terapeutica a lungo termine nelle pazienti con TNBC in assenza di risposta patologica completa⁵³⁻⁵⁵.

Visti questi risultati i TILs vengono ad oggi considerati un biomarcatore prognostico raccomandato dalle linee guida per il trattamento dell'early-stage TNBC³⁰. Tuttavia, vi sono dei limiti nel loro utilizzo. In primis la variabilità inter-osservatore dovuta all'interpretazione soggettiva dei patologi: questa potrebbe essere risolta grazie ad algoritmi di intelligenza artificiale e patologia digitale⁴⁴. Poi vi è l'assenza di cut-off universali dato che i valori soglia (10%, 30%, 50%) sono variabili tra i diversi studi, rendendo difficile l'armonizzazione dei dati e l'applicazione clinica omogenea⁵⁶. Inoltre vi è un'importante eterogeneità spaziale e temporale: i livelli di TILs possono variare significativamente tra la lesione primitiva e le metastasi⁵⁶. Infine non vi è ancora una classificazione sul ruolo delle singole popolazioni linfocitarie (CD8+, CD4+, Treg, CD20+, CD56+)⁵⁷.

Ad oggi non è chiaro se i TILs oltre ad avere un'efficacia prognostica abbiano anche un valore predittivo di risposta all'immunoterapia. Una delle potenziali applicazioni cliniche dei TILs nell'early-stage TNBC è l'opportunità di de-escalation della terapia. Per i pazienti con alti livelli di TILs, ci si chiede se abbiano effettivamente bisogno di ulteriori trattamenti aggressivi o se possano evitare in sicurezza una chemioterapia più tossica. Sulla base dei risultati dello studio NeOPACT, lo studio SCARLET sta valutando il ruolo dei TIL nell'identificare i pazienti che hanno maggiori probabilità di raggiungere una pCR con una chemioterapia non a base di antracicline in combinazione con pembrolizumab^{58,59}. Attualmente, sono in fase di pianificazione ulteriori studi clinici attraverso gruppi cooperativi (tra cui gli studi EORTC2275 OPTIMAL, TIL-CHOICE ed ETNA) per valutare i sTIL come biomarcatori atti a de-escalare la

terapia ed evitare del tutto la chemioterapia in un sottogruppo selezionato di pazienti con early-stage TNBC.

1.4.2 PD-L1

PD1(Programmed Death 1) è una proteina transmembranaria di tipo 1 espressa su linfociti T e B, cellule presentanti l'antigene, macrofagi e cellule dendritiche⁶⁰. La sua interazione con il suo ligando PD-L1 sulle cellule tumorali trasmette un segnale soppressivo, riducendo la risposta immune antitumorale e consentendo un'attività pro-tumorigenica, favorendo la proliferazione neoplastica e inibendo i segnali pro-apoptotici^{60,61}.

Nel TNBC, la positività per PD-L1 varia indicativamente tra il 20% e il 42% dei casi avanzati, con percentuali più elevate (45–55%) nei tumori in stadio precoce⁶². Attualmente PD-L1 è raccomandato come marcatore predittivo positivo di risposta all'immunoterapia nel TNBC solamente per il setting metastatico²⁸; nel setting precoce invece questo valore non è osservato: infatti nel trial KEYNOTE-522 non vi è stata differenza nel beneficio nell'uso di pembrolizumab tra i pazienti PD-L1 positivi e quelli PD-L1 negativi^{29,63}. A livello prognostico invece PD-L1 nel TNBC non è raccomandato dato che diversi studi hanno dimostrato risultati contrastanti: in alcuni studi vi è stato un aumento della sopravvivenza libera da malattia e della sopravvivenza globale nei pazienti con maggiore espressione di PD-L1^{64,65}; in altri studi invece i maggiori livelli di PD-L1 hanno dimostrato un peggioramento negli stessi outcome^{66–68}.

Nonostante l'importanza della valutazione di PD-L1, essa presenta limitazioni significative. Innanzitutto i cloni validati (SP142, SP263, 22C3, 28-8) utilizzano piattaforme diverse e non sono intercambiabili^{69–71}. Poi i diversi score utilizzati (Combined Positive Score o CPS e Immune Cell score o IC) identificano sottopopolazioni distinte di pazienti e la discordanza tra essi può portare a decisioni terapeutiche differenti per lo stesso paziente, inoltre la lettura dei patologi all'immunoistochimica è causa di variabilità interosservatore^{72,73}. Un'altra criticità è legata all'eterogeneità spaziale e temporale dato che vi è differenza tra campioni del tumore primario e quelli delle metastasi⁷⁴.

1.4.3 Biomarcatori prognostici circolanti: le citochine

Tutti i biomarcatori attualmente approvati si basano su misurazioni definite statiche, perché basate sul prelievo biotico del tessuto tumorale. Tuttavia, vi è la necessità di ottenere marcatori dinamici (ovvero misurabili in più tempi) da matrici facilmente accessibili, come il prelievo di sangue periferico⁷⁵.

I biomarcatori circolanti sono molecole o sostanze biologiche presente nei fluidi corporei che possono essere misurate in modo oggettivo e che rappresentino l'evoluzione di un processo pato-fisiologico. La maggior parte di questi marcatori sono dosati nel sangue periferico sia nella parte plasmatica che corpuscolata. Rispetto ai biomarcatori tissutali hanno il vantaggio che possono essere considerati dei biomarcatori dinamici, nel senso che possono variare nel corso della patologia e possono essere misurati in più momenti durante il trattamento e il follow-up⁷⁵. Tra i possibili candidati a questo ruolo vi sono le citochine circolanti^{75,76}.

Le citochine sono potenti regolatori secreti di diversi tipi e attività cellulari, in particolare all'interno del sistema immunitario⁷⁷. Le principali classi di citochine coinvolte nella comunicazione cellulare durante l'omeostasi e i processi patologici includono le interleuchine, gli interferoni, alcuni membri della superfamiglia del fattore di necrosi tumorale (TNF), le chemochine e i fattori di crescita. Le citochine agiscono generalmente a livello paracrino e/o autocrino, con una produzione transitoria strettamente controllata che stimola il network di segnalazione di questi mediatori proteici solubili⁷⁸⁻⁸². La maggior parte delle citochine è stata inizialmente identificata come prodotto e regolatore delle cellule immunitarie, sebbene molte siano prodotte anche da cellule mesenchimali ed epiteliali. Alcune citochine appartengono a superfamiglie complesse caratterizzate da funzioni sovrapponibili e dalla condivisione di recettori e antagonisti recettoriali⁸³.

Le citochine sono mediatori chiave della comunicazione cellulare nel microambiente tumorale. Mentre citochine come IL-2, IFN α e IFN γ possono contribuire alle risposte antitumorali nel TME, una produzione citochinica disregolata da parte di cellule maligne, cellule immunitarie e cellule stromali è coinvolta in tutte le fasi della carcinogenesi, nonché nelle risposte alla terapia^{83,84}. Alcune citochine sono fortemente implicate nello sviluppo, nella progressione e nella metastatizzazione del tumore, e la produzione anomala di citochine infiammatorie è una comune conseguenza a valle di alterazioni oncogeniche in

cellule altrimenti non maligne⁸⁵. Pertanto, sebbene si stimi che una quota compresa tra il 10% e il 25% di tutti i tumori insorga come sequela di malattie infiammatorie croniche, la trasformazione maligna può essa stessa causare un cambiamento infiammatorio nel TME, in particolare attraverso la produzione di citochine pro-tumorali^{86,87}.

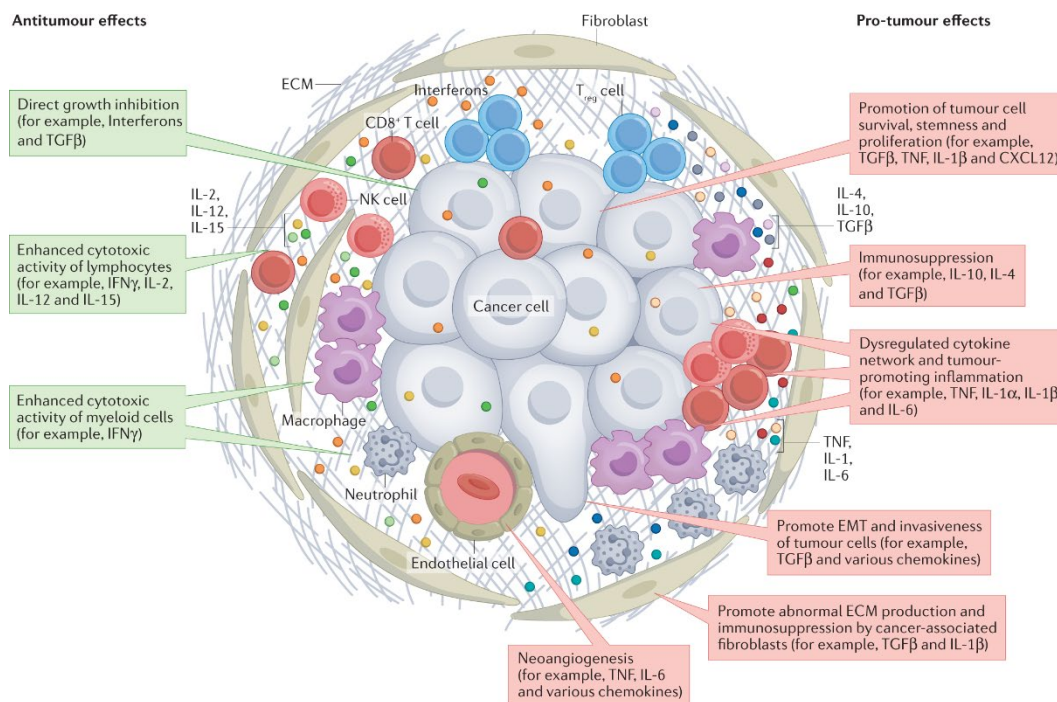


Figura 3: le azioni delle citochine nel microambiente tumorale. Le azioni esercitate sui diversi tipi cellulari da parte delle citochine sono rappresentate da rettangoli rossi e verdi, che indicano rispettivamente le azioni pro-tumorali e quelle antitumorali. Alcune citochine, come TGFβ, possono esercitare un'attività sia antitumorale sia pro-tumorale a seconda del contesto. Ref. ⁸⁸

Poiché le citochine vengono rilasciate nella circolazione sistemica, la loro misurazione nel sangue periferico (siero o plasma) offre una finestra minimamente invasiva sullo stato immunologico dell'interfaccia tumore-ospite. A differenza dei biomarcatori tissutali, che richiedono una biopsia e riflettono soltanto un'istantanea spaziale del TME, le citochine circolanti possono essere campionate longitudinalmente, consentono di cogliere le dinamiche immunitarie sistemiche e si prestano a saggi multiplex standardizzati ad alta processività⁸⁹. Queste caratteristiche hanno alimentato un crescente corpo di letteratura volto a indagare se i livelli di citochine plasmatiche o sieriche possano fungere da biomarcatori prognostici in un ampio spettro di neoplasie^{90,91}.

Le citochine circolanti sono state riconosciute come un potenziale marcatore prognostico in diversi tumori; in particolare il loro valore prognostico è stato

riconosciuto nel melanoma, nel carcinoma polmonare non a piccole cellule, nel carcinoma colonrettale, nel cancro gastrico, nel carcinoma prostatico, nel carcinoma ovarico, nelle neoplasie testa-collo e nel carcinoma uroteliale⁹²⁻⁹⁹. La semplicità con cui possono essere ottenuti i campioni di plasma necessari per le analisi, i bassi costi dei test disponibili e la possibilità di valutarne l'evoluzione nel tempo le rendono uno strumento interessante da studiare come potenziale supporto alla clinica^{89,100}.

Nel contesto del TNBC le citochine rappresentano dei mediatori fondamentali che agiscono modulando la progressione tumorale, la risposta immunitaria, l'angiogenesi e la resistenza terapeutica attraverso reti di segnalazione complesse e interconnesse^{101,102}. Vi sono diversi studi esplorativi che correlano i livelli di citochine plasmatiche con diversi outcome quali risposta patologica completa dopo chemioterapia neoadiuvante, sopravvivenza libera da malattia e sopravvivenza globale^{101,103-106}. Inoltre è stato dimostrato che i livelli di citochine infiammatorie sono correlati all'attivazione immunitaria nel microambiente tumorale e in particolare alla presenza di TILs¹⁰⁶.

Alcune citochine in particolare sono state studiate correlando la loro espressione nel TNBC alla prognosi. La **Tabella II** riporta quelle più studiate e significative. Si può osservare come le citochine con valore prognostico negativo nel TNBC agiscono prevalentemente attraverso le vie NF- κ B, JAK/STAT3 e MAPK, promuovendo la proliferazione tumorale, l'angiogenesi, l'evasione immunitaria e la metastatizzazione (IL-6, IL-8/CXCL8, IL-17A, CCL2, CCL5, CXCL1)¹⁰⁷⁻¹¹². Le citochine con valore prognostico positivo riflettono ampiamente l'attivazione di una risposta immunitaria antitumorale, in particolare il reclutamento di linfociti T CD8+ mediato da Th1 (CXCL9, CXCL10, CXCL13) e marcatori di attivazione immunitaria sistemica che correlano con una maggiore densità di TIL e con la pCR (IL-2, IL-5, GM-CSF)^{106,113-115}. È importante sottolineare come alcune citochine mostrino effetti prognostici contesto-dipendenti: un'elevazione basale del VEGF è sfavorevole, ma la sua riduzione durante la chemioterapia neoadiuvante predice la risposta terapeutica^{116,117}. Allo stesso modo, l'IFN- γ correla positivamente con i TILs nei pazienti responder, ma risulta elevato anche nel TNBC metastatico^{105,106}. Il TNF- α promuove l'infiammazione pro-metastatica nel TME,

ma mostra una relazione complessa con la risposta al trattamento in base al contesto dei TILs^{106,110}.

Citochina	Valore prognostico	Outcome	Pathway ed effetti	Azione nel TNBC	Ref.
IL-6	Negativo (↑ = peggiora)	DFS, OS, risposta alla NAC	JAK/STAT3, NF-κB; crescita tumorale, infiammazione, evasione immunitaria	Promotes tumor proliferation, survival, and chemoresistance; independent prognostic factor for OS	<i>105–107,109,118–120</i>
IL-8 (CXCL8)	Negativo (↑ = peggiora)	PFS	NF-κB, EGFR-Akt; network di infiammazione tumore-stroma	Promuove l'angiogenesi, la metastatizzazione linfonodale, la migrazione e l'invasione; sopprime le cellule NK via CXCR1/2	<i>105,108,109,113,121–123</i>
IL-17A	Negativo (↑ = peggiora)	PFS, OS	Asse Th17/IL-17A-VEGFA; rimodellamento dello stroma	Promuove l'angiogenesi, la resistenza all'anoikis, la migrazione e la EMT; aumenta nei TNBC di alto grado e metastatici	<i>114–117</i>
VEGF-A	Contesto-dipendente	pCR (↓ durante NAC = favorevole); RFS, OS (↑ baseline = peggiora)	VEGF/VEGFR	Promuove l'angiogenesi; diminuzione nel siero durante NAC predice pCR; elevate livelli intratumorali sono associati ad una ridotta sopravvivenza	<i>116,124,125</i>
CCL2 (MCP-1)	Negativo (↑ = peggiora)	pCR (↑ = malattia residua)	CCL2/CCR2-AKT/β-catenin; NF-κB	Recluta TAMs and MDSCs; promuove l'EMT, la staminalità, l'angiogenesi e un TME immunosoppressivo	<i>110,126–128</i>
CCL5 (RANTES)	Negativo (↑ = peggiora)	Metastasi, progressione	CCL5/CCR5; feedback positivo su PAI-1	Promuove la migrazione, l'invasione e la metastatizzazione; recluta cellule Th2 e MDSCs; aumenta la crescita tumorale	<i>109,126,129,130</i>
CXCL1	Negativo (↑ = peggiora)	DDFS	NF-κB, MAPK, EGFR-Akt; CXCR1/2 signaling	Promuove la crescita tumorale, la metastatizzazione e la soppressione delle cellule NK attraverso la downregolazione della via NKG2D/TRAIL/IFN-γ	<i>113,131,132</i>
CXCL5	Negativo (↑ = peggiora)	pCR (↑ = malattia residua)	Asse IL-17A-ENA-78(CXCL5)-SCF	Associata con la malattia residua dopo chemioimmunoterapia neoadiuvante; legata all'aggressività del TNBC	<i>116,128</i>
IL-5	Positivo (↑ = migliora)	PFS, pCR	Risposta Th2; inibisce cancerogenesi	Livelli plasmatici elevati pre-trattamento predicono maggiori PFS e pCR	<i>111</i>

Citochina	Valore prognostico	Outcome	Pathway ed effetti	Azione nel TNBC	Ref.
GM-CSF	Positivo (↑ = migliora)	PFS, pCR	Attivazione immunitaria; modulazione della risposta Th2	Livelli plasmatici elevati pre-trattamento predicono pCR e maggiore PFS; favorisce la maturazione delle cellule immunitarie	¹¹¹
IL-2	Positivo (↑ = migliora)	pCR (trend per PFS)	Risposta Th1; proliferazione e attivazione delle cellule T	Classica citochina Th1; maggiori livelli si associano a pCR e densità di TILs	¹¹¹
FGF	Positivo (↑ = migliora)	PFS, pCR	Signaling dei fattori di crescita; formazione di vasi	Livelli elevati pre-trattamento predicono una maggiore PFS e pCR	¹¹¹
IL-7	Positivo (↑ = migliora)	PFS	Omeostasi delle cellule T	Sviluppo dei linfociti; maggiori livelli correlano con una maggiore PFS	¹¹¹
CXCL9	Positivo (↑ = migliora)	DFS, OS	Asse CXCL9/CXCR3; reclutamento delle cellule T CD8+	Attira cellule T CD8+ nel TME; elevate espressione correla con miglior DFS e OS	¹³³⁻¹³⁵
CXCL10 (IP-10)	Positivo (↑ = migliora)	OS (dopo-ICI)	Asse CXCL10/CXCR3; chemiotassi delle cellule T	Attira cellule T CD8+; elevate espressione correla con miglior OS dopo pembrolizumab	¹³³
CXCL13	Positivo (↑ = migliora)	OS, DFS	CXCL13/CXCR5; reclutamento delle cellule B e TFH	Promuove la formazione di strutture linfoidi terziarie; si associa a maggior densità di TILs e ad un TME ricco di cellule immunitarie; aumenta nel siero nel TNBC metastatico	¹³⁵⁻¹⁴⁰
IFN-γ	Contesto-dipendente	pCR (correlazione positive con TILs nei responders); elevato nel TNBC metastatico	Via Th1/JAK-STAT1; immunità anti-tumorale	Correla positivamente con la densità di TILs nei pazienti responders; aumenta nel TNBC metastatico	^{111,116,141-143}
IL-12p70	Negativo (↑ con lo stadio peggiora)	Stadio-dipendente (aumentata negli stadi avanzati)	Risposta Th1/Th17; coordina risposta infiammatoria	Hub centrale delle risposte Th1 e Th17; aumenta negli stadi avanzati; coordina il rimodellamento dello stroma	^{116,144,145}

Citochina	Valore prognostico	Outcome	Pathway ed effetti	Azione nel TNBC	Ref.
MIP-1α (CCL3)	Negativo (↑ = peggiora con stadio)	Stadio-dipendente (aumentata negli stadi avanzati)	Chemochina pro-infiammatoria; recluta macrofagi	Aumentata negli stadi avanzati; promuove metastatizzazione tramite il reclutamento di TAMs	^{116,146}
TNF-α	Contesto-dipendente	pCR, OS (↑ = peggiora nei tumori post-menopausali)	NF- κ B; infiammazione dello stroma tumorale	Guida l'espressione di CXCL8/CCL2/CCL5 nel TME; correla negativamente con la densità di TILs nei pazienti non-responders; promuove la metastatizzazione	^{107,109,111,120,147-149}
TSLP	Negativo (↑ = peggiora)	Metastasi (aumenta nel TNBC metastatico)	Polarizzazione Th2; rimodellamento dello stroma; evasione immunitaria	Hub centrale che coordina l'evasione immunitaria; aumenta nel TNBC metastatico	¹¹⁶
IL-18	Negativo (↑ = peggiora con stadio)	Stadio-dipendente (aumentata negli stadi avanzati)	Via dell'inflammasoma/IL-18; risposta Th1	Aumentata negli stadi avanzati	¹¹⁶
Fractalkine (CX3CL1)	Poteniale marcatore diagnostico (↑ in TNBC vs. sani)	Potenzialmente diagnostico	CX3CL1/CX3CR1; adesione e migrazione dei leucociti	Poteniale marcatore diagnostico; controllo del trafficking immunitario	¹⁰⁵

Tabella II: sintesi delle citochine e chemochine circolanti valutate in studi clinici per la loro associazione prognostica con gli esiti clinici nelle pazienti affette da TNBC. Per ciascun biomcatore, la tabella riporta la direzione dell'effetto prognostico (positivo: livelli più elevati associati a esiti favorevoli; negativo: livelli più elevati associati a esiti sfavorevoli; contesto-dipendente: effetto variabile a seconda dello stadio della malattia o del contesto terapeutico), gli esiti clinici valutati [tra cui la sopravvivenza libera da progressione (PFS), la sopravvivenza libera da malattia (DFS), la sopravvivenza libera da malattia a distanza (DDFS), la sopravvivenza globale (OS), la risposta patologica completa (pCR) e la sopravvivenza libera da recidiva (RFS)], le principali vie di segnalazione o meccanismi implicati e l'effetto funzionale nella biologia del TNBC. Le frecce indicano la direzione del livello del biomcatore associata all'effetto prognostico indicato (↑ = elevato; ↓ = ridotto.) Abbreviazioni: DFS, disease-free survival; EGFR, epidermal growth factor receptor; EMT, epithelial-mesenchymal transition; FGF, fibroblast growth factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HC, healthy controls; ICI, immune checkpoint inhibitors; IL, interleukin; JAK, Janus kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MDSC, myeloid-derived suppressor cell; NAC, neoadjuvant chemotherapy; NF- κ B, nuclear factor kappa B; NK, natural killer; OS, overall survival; pCR, pathological complete response; PFS, progression-free survival; RFS, recurrence-free survival;

STAT, signal transducer and activator of transcription; TAM, tumor-associated macrophage; TFH, T follicular helper; Th, T helper; TILs, tumor-infiltrating lymphocyte; TME, tumor microenvironment; TNBC, triple-negative breast cancer; TSLP, thymic stromal lymphopoietin; VEGF, vascular endothelial growth factor.

1.5 Scopo della tesi

Visto il potenziale ruolo prognostico delle citochine nel TNBC suggerito da diversi studi e considerato il forte razionale biologico che le alterazioni delle citochine hanno nell'influenzare il microambiente, in un contesto dominato dalla necessità di sviluppare nuovi biomarcatori prognostici affidabili, facilmente dosabili e dinamici, questo studio si pone come obiettivo quello di valutare i livelli plasmatici di citochine raccolte prospetticamente nell'ambito dello studio randomizzato di fase III A-BRAVE e determinarne il potenziale significato prognostico.

Materiali e metodi

2.1 Disegno dello studio A-BRAVE e timing di raccolta dei campioni biologici

Il presente elaborato costituisce un'analisi traslazionale dello studio A-BRAVE, finanziata in parte con fondi dell'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC).

Lo studio A-BRAVE è uno studio di fase III, randomizzato, prospettico, multicentrico che ha randomizzato 466 pazienti affette da early-stage TNBC ad alto rischio (strato A: pN2 pN1/pT2 o pN0/pT3 dopo l'intervento chirurgico primario; strato B: malattia residua invasiva in mammella e/o linfonodi dopo la chemioterapia neoadiuvante) a ricevere un anno di avelumab rispetto alla sola osservazione, dopo aver completato il trattamento ad intento curativo standard (trattamento locoregionale e chemioterapia neo- e/o adiuvante).

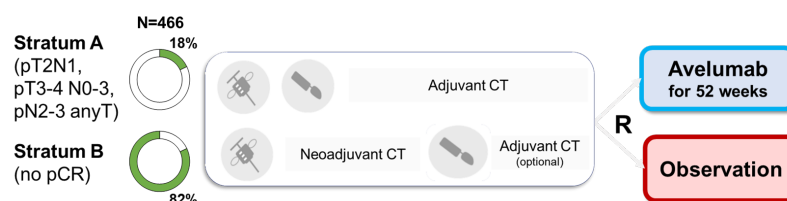


Figura 4: composizione della popolazione inclusa nello studio A-BRAVE suddivisa per il setting di trattamento.

All'interno dello studio A-BRAVE era prevista la raccolta prospettica di materiale biologico, inclusi prelievi ematici per l'analisi delle citochine circolanti, a diversi time-point: all'arruolamento (baseline), a quattro mesi dalla randomizzazione, ad un anno dalla randomizzazione e infine ad eventuale progressione di malattia.

Nell'ambito delle analisi presentate nel presente elaborato, sono stati considerati solo i campioni raccolti al baseline, corrispondenti ad una popolazione di 322 (69.1%) pazienti sul totale dei 466 pazienti dello studio A-BRAVE, in particolare 60 (72,3%) pazienti dallo strato A e 262 (68,4%) pazienti dallo strato B.

2.2 Metodologia di analisi dei campioni

2.2.1 Processazione ed analisi dei campioni

Il plasma è stato separato mediante centrifugazione a 1000 g per 10 minuti a 4°C entro 30 minuti dalla raccolta, aliquotato e conservato a -80°C fino all'analisi. Tutti i campioni hanno subito un massimo di due cicli di congelamento-scongelo prima del dosaggio.

2.2.2 Quantificazione multiplex delle citochine

Le concentrazioni plasmatiche di 47 citochine, chemochine e fattori di crescita sono state quantificate simultaneamente utilizzando il MILLIPLEX® MAP Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A — Magnetic Bead Panel (catalogo n. HCYTA-60K, Merck Millipore, Burlington, MA, USA), un immunodosaggio multiplex su microsferi basato sulla piattaforma tecnologica Luminex xMAP®. Gli analiti misurati comprendevano: sCD40L, EGF, Eotassina, FGF-2, FLT-3L, Fractalkine, G-CSF, GM-CSF, GRO α , IFN α 2, IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, IP-10, MCP-1, MCP-3, M-CSF, MDC, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF α , TNF α , TNF β e VEGF-A. In **Tabella III** si riporta il pannello completo con il ruolo biologico di ciascuna citochina nel TNBC.

Citochina	Recettore	Pathway	Ruolo biologico nel TNBC	Ref.
sCD40L (CD154)	CD40	NF- κ B, MAPK, STAT3	L'interazione di CD40/CD40L su linfociti T attivati con le cellule di TNBC aumenta la produzione di TGF- β e induce l'espressione di IL-17, potenziando la proliferazione cellulare tramite la via di segnalazione STAT3; la soppressione di CD154 mediata da CCR2 riduce l'attività dei linfociti T CD8 ⁺ e favorisce l'evasione immunitaria del tumore	150-152
EGF	EGFR (ErbB1)	EGFR→Akt/ERK (MAPK)	Le cellule di TNBC esprimono alti livelli di EGFR; l'EGF aumenta la produzione di chemochine pro-infiammatorie (CXCL1, CXCL2, CXCL8) tramite la via di segnalazione di Akt, promuovendo l'infiammazione, la progressione tumorale e la metastatizzazione	136
Eotaxin (CCL11)	CCR3	JAK/STAT, MAPK	Bassi livelli di eotassina correlano con una maggiore presenza di TILs nel TNBC; agisce come chemioattrattore per gli eosinofili; associazione inversa con la risposta immunitaria antitumorale.	103,153
FGF-2 (bFGF)	FGFR1-4	RAS/MAPK, PI3K/Akt	Fattore di crescita pro-angiogenetico elevato nel fluido interstiziale del tumore mammario; livelli plasmatici più alti nelle pazienti con TNBC che raggiungono una pCR alla chemioterapia neoadiuvante; promuove la formazione di vasi sanguigni e il rimodellamento stromale	106,154,155
FLT-3L	FLT3 (CD135)	RAS/MAPK, PI3K/Akt, STAT5	Promuove la differenziazione e l'espansione delle cellule dendritiche; potenzia la presentazione dell'antigene e l'immunità antitumorale; potenziale ruolo nel modulare il microambiente immunitario del TNBC	156,157
Fractalkine (CX3CL1)	CX3CR1	EGF pathway, PI3K/Akt, NF- κ B	Significativamente sovraespresso nel TNBC; promuove la proliferazione, l'EMT (transizione epitelio-mesenchimale) e il reclutamento delle cellule immunitarie	158,159
G-CSF (CSF3)	G-CSFR (CSF3R)	JAK/STAT3	Derivato dagli adipociti associati al cancro (CAA) attiva STAT3 nelle cellule di TNBC, promuovendo l'EMT, la migrazione, l'invasione e la sovraespressione di MMP2/MMP9 (metalloproteasi di matrice); guida la polarizzazione dei macrofagi in senso immunosoppressivo; è associato a una prognosi infausta in termini di sopravvivenza globale (OS)	160,161
GM-CSF (CSF2)	GM-CSFR α/β c	JAK2/STAT5, MAPK, PI3K/Akt	Fattore secreto dallo stroma nel TNBC; può promuovere la modulazione del fenotipo Th2; duplice ruolo sia nella soppressione della cancerogenesi sia della promozione	162-165
GRO α (CXCL1)	CXCR2	ERK/MAPK, NF- κ B	Soprattutto espresso nel TNBC basal-like; guidato dalla cascata LPA-LPAR2-EZH2-NF- κ B; promuove il reclutamento dei neutrofili, la migrazione e l'invasione tramite l'asse ERK/MMP-2/9; la secrezione di CXCL1 da parte delle cellule di TNBC recluta le MSC (cellule staminali mesenchimali) e facilita la formazione della nicchia metastatica	135,166,167

IFN α 2	IFNAR1/IFNAR2	JAK1/TYK2→STAT1/STAT2→ISGF3	Un'elevata firma genica (signature) dell'IFN α è associata a un miglioramento della DFS (sopravvivenza libera da recidiva) e della OS (sopravvivenza globale) nel TNBC; attiva la risposta dell'IFN di tipo I tramite la via di segnalazione cGAS-STING; potenzia l'immunità antitumorale	143,168
IFN γ	IFNGR1/IFNGR2	JAK1/JAK2→STAT1	Significativamente sovraespresso nel TNBC, con picco in fase metastatica; positivamente correlato con i TILs nei pazienti che rispondono alla terapia; la perdita di ELF5 stabilizza IFNGR1 promuovendo la progressione tumorale e l'espressione di PD-L1; un'elevata firma genica dell'IFN γ è associata a un miglioramento della OS (sopravvivenza globale)	105,142,143,169–171
IL-1 α	IL-1R1/IL-1RAcP	NF- κ B, MAPK (p38, JNK)	Citochina pro-infiammatoria della famiglia di IL-1; attiva le cascate infiammatorie guidate da NF- κ B nel TME (microambiente tumorale); promuove il reclutamento delle cellule immunitarie e il rimodellamento infiammatorio; contribuisce alla formazione della nicchia metastatica	172–178
IL-1 β	IL-1R1/IL-1RAcP	NF- κ B, PI3K/mTOR, MAPK	L'IL-1 β indotta dai linfociti B attiva la via di segnalazione di NF- κ B, sovra-regolando le MMP e promuovendo l'invasione e la migrazione; conferisce proprietà simil-staminali tramite l'asse PI3K/mTOR/HIF-1 α ; coordina l'asse immunosoppressivo CCL2–macrofagi–IL-1 β –linfociti T $\gamma\delta$ –IL-17; è associata a una peggiore sopravvivenza nel TNBC invasivo	110,172,179–181
IL-1RA	IL-1R1 (antagonista)	Blocco del signaling IL-1R1	Elevato nel fluido interstiziale del tumore mammario; agisce come antagonista naturale delle vie di segnalazione di IL-1 α/β ; ampiamente espresso dalle cellule tumorali e dai TILs	154,174,182,183
IL-2	IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$ c	JAK1/JAK3→STAT5	Classica citochina Th1 responsabile della proliferazione, maturazione e attivazione dei linfociti; livelli più elevati nelle pazienti con TNBC che raggiungono una pCR; nodo centrale nelle reti di citochine infiammatorie nei pazienti che rispondono alla terapia	169,184
IL-3	IL-3R α/β c (CD123)	JAK2→STAT5	Significativamente sovraespresso (up-regolato) nel TNBC; l'asse IL-3/STAT5A promuove l'espressione di miR-155-5p, guidando l'attivazione di β -catenina–c-Myc, la staminalità tumorale, la chemioresistenza e la metastatizzazione; l'asse IL-3–IL-21 guida l'aggressività del TNBC	105,185,186
IL-4	IL-4R α/γ c (Tipo I); IL-4R α /IL-13R α 1 (Tipo II)	JAK1/JAK3→STAT6	L'espressione di IL-4R α diminuisce con l'età nel tessuto mammario; la perdita della segnalazione di IL-4R α accelera l'insorgenza del tumore mammario e aumenta le metastasi nei modelli murini; possibile ruolo nell'omeostasi epiteliale mammaria	187–192
IL-5	IL-5R α/β c	JAK2→STAT3/STAT5	Sovraespressa nei tumori TNBC di alto grado; alti livelli nel fluido interstiziale tumorale sono associati a una prognosi peggiore	105,154,169,193

IL-6	IL-6R/gp130	JAK/STAT3, NF-κB, MAPK	Fattore chiave della crescita del TNBC; loop autocrino IL-6/STAT3/NF-κB attivato dalla perdita di p53/PTEN; l'inibizione concomitante di IL-6 e IL-8 blocca la formazione di colonie e la crescita tumorale; promuove l'EMT, l'evasione immunitaria e la resistenza terapeutica	109,119,194-197
IL-7	IL-7Rα/γc	JAK1/JAK3→STAT5	Elevato nel fluido interstiziale del tumore mammario; correla con i livelli di TILs; supporta la sopravvivenza e l'omeostasi dei linfociti T nel TME	154,169,198-201
IL-8 (CXCL8)	CXCR1/CXCR2	NF-κB, ERK/MAPK, PI3K/Akt	Significativamente sovraespresso nel TNBC; sopprime la funzione delle cellule NK tramite l'asse CXCR1/2-Akt-Bcl2; promuove l'angiogenesi, la migrazione e l'evasione immunitaria; la co-inibizione con IL-6 inibisce la crescita tumorale	105,109,110,126,202,203
IL-9	IL-9R/γc	JAK1/JAK3→STAT1/STAT3/STAT5	Citochina derivata dai linfociti Th9; contribuisce all'immunità antitumorale potenziando le risposte dei macrofagi M1 e dei linfociti T	105,204-207
IL-10	IL-10R1/IL-10R2	JAK1/TYK2→STAT3	Citochina immunosoppressiva; i TAM (macrofagi associati al tumore) con polarizzazione M2 secernono IL-10 per promuovere l'evasione immunitaria; la via di segnalazione IL-10/STAT3/Bcl-2 promuove l'angiogenesi, l'EMT e la chemioresistenza	208-214
IL-12 (p40)	IL-12Rβ1 (condiviso con IL-23)	JAK2/TYK2→STAT4	Subunità condivisa con l'IL-23; elevata nel fluido interstiziale del tumore mammario; contribuisce alla polarizzazione Th1 e all'immunità antitumorale	144,154,215,216
IL-12 (p70)	IL-12Rβ1/IL-12Rβ2	JAK2/TYK2→STAT4	Significativamente sovraespresso nel TNBC, in particolare negli stadi avanzati; hub centrale che coordina le risposte infiammatorie Th1/Th17; promuove la produzione di IFN-γ da parte delle cellule NK e dei linfociti T; supporta l'immunità antitumorale	105,145,217-220
IL-13	IL-13Rα1/IL-4Rα (Tipo II); IL-13Rα2 (decoy)	JAK1/TYK2→STAT6	Livelli plasmatici più elevati nelle pazienti con TNBC che rispondono con una pCR; la perdita della segnalazione di IL-13 accelera l'insorgenza del tumore e la metastatizzazione nei modelli murini; può svolgere un ruolo protettivo nell'omeostasi epiteliale mammaria insieme all'IL-4	169,190,192,221-223
IL-15	IL-15Rα/IL-2Rβ/γc	JAK1/JAK3→STAT3/STAT5	Supporta la proliferazione e la citotossicità delle cellule NK e dei linfociti T CD8+; potenzia la sorveglianza immunitaria antitumorale nel TME	224-228

IL-17A	IL-17RA/IL-17RC	MAPK (ERK1/2), NF- κ B, STAT3, JNK	Sovraespressa nei TNBC di alto grado; promuove la migrazione, la resistenza all'anoikis, l'angiogenesi (tramite VEGFA) e la proliferazione attraverso la via ERK1/2; espande le MDSC (cellule soppressorie di derivazione mieloide); è associata a una peggiore DFS e OS	105,127,130,229,230
IL-17E/IL-25	IL-17RA/IL-17RB	c-RAF→ERK1/2, p70 S6 Kinase	Recluta la via di segnalazione c-Raf/S6 chinasi; promuove la proliferazione e la sopravvivenza; genera forme a basso peso molecolare tumorigeniche della ciclina E; paradossalmente, l'IL-25 proveniente da cellule epiteliali non maligne può indurre l'apoptosi nelle cellule tumorali che esprimono alti livelli di IL-25R	230–233
IL-17F	IL-17RA/IL-17RC	NF- κ B, MAPK	Forma un eterodimero con l'IL-17A; membro pro-infiammatorio della famiglia di IL-17; contribuisce al reclutamento dei neutrofili e all'immunità antibatterica; implicato nella cancerogenesi mediata dall'infiammazione, con un duplice ruolo pro- e anti-tumorale	234–241
IL-18	IL-18R α /IL-18R β	NF- κ B, MAPK (p38, JNK)	Elevata negli stadi avanzati di TNBC; promuove la produzione di IFN- γ e le risposte Th1; potenzia la citotossicità delle cellule NK; può contribuire sia all'immunità antitumorale sia alla progressione tumorale guidata dall'infiammazione	105,242
IL-22	IL-22R1/IL-10R2	JAK1/TYK2→STAT3	Promuove la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule epiteliali; può contribuire alla riparazione tissutale e alla progressione tumorale nel TME del TNBC	105,243,244
IL-27	IL-27R α (WSX-1)/gp130	JAK1/JAK2→STAT1/STAT3	Sia attività antitumorale (mediata da STAT1) che pro-tumorale (mediata da STAT3); modula la differenziazione Th1 e l'immunità antitumorale	105,245–247
IP-10 (CXCL10)	CXCR3	NF- κ B, JAK/STAT	Correla con alti livelli di TILs; promuove il reclutamento di linfociti T e cellule NK nel TME; l'espressione guidata da NF- κ B è indotta dall'inibizione dell'autofagia; è anche implicata nelle metastasi ossee tramite la via di NF- κ B	154,168,248–251
MCP-1 (CCL2)	CCR2 (primario); CCR4	Smad3, p42/44 MAPK, PI3K/Akt, NF- κ B	Espressa a livelli significativamente più elevati nel TNBC basal-like; recluta monociti CCR2+ e TAM (macrofagi associati al tumore); promuove l'angiogenesi, la crescita tumorale, l'invasione e la metastatizzazione; la via di segnalazione CCL2/CCR2 coordina la sopravvivenza e la motilità cellulare attraverso l'asse Smad3/MAPK	110,132,248,252–254
MCP-3 (CCL7)	CCR1, CCR2, CCR3	MAPK, JAK/STAT	Chemiotattico per i monociti; recluta monociti e altre cellule immunitarie nel TME	137,255,256
M-CSF (CSF1)	CSF1R (CD115)	PI3K/Akt, MAPK, JAK/STAT	Fattore chiave del differenziamento dei monociti in macrofagi e della polarizzazione dei TAM in senso M2; promuove un TME immunosoppressivo; la terapia anti-CSF-1R, in presenza di alti livelli di G-CSF, può paradossalmente promuovere TAM anti-infiammatori e potenziare la metastatizzazione	161,257–260

MDC (CCL22)	CCR4	PI3K/Akt, NF-κB	Chemiotattico per i linfociti Treg e Th2 tramite il recettore CCR4; promuove un TME immunosoppressivo reclutando i linfociti Treg nel sito tumorale	261–264
MIG (CXCL9)	CXCR3	JAK/STAT, NF-κB	Modula il TME influenzando il reclutamento dei linfociti T e il differenziamento dei macrofagi; l'asse MUC1-C e CXCL9 influisce sulla deplezione dei linfociti T; promuove risposte immunitarie antitumorali di tipo Th1	265–267
MIP-1α (CCL3)	CCR1, CCR5	MAPK, NF-κB, PI3K/Akt	Significativamente sovraespresso nel TNBC, in particolare negli stadi avanzati; promuove il reclutamento di cellule immunitarie (monociti, linfociti T, cellule NK) nel TME	105,268,269
MIP-1β (CCL4)	CCR5, CCR8	MAPK, PI3K/Akt, NF-κB	Recluta cellule immunitarie nel TME; associato alle metastasi ossee nel carcinoma mammario	105,191,269,270
PDGF-AA	PDGFRα	RAS/MAPK, PI3K/Akt, PLCγ	Fattore pro-angiogenetico up-regolato nei tumori mammari; l'espressione di PDGFA correla negativamente con l'età alla diagnosi; regola la funzione di VEGF-A spiazzandolo dal recettore VEGFR-1; promuove il rimodellamento dello stroma e il reclutamento dei periciti	271–274
PDGF-AB/BB	PDGFRα/β	RAS/MAPK, PI3K/Akt, PLCγ	Elevato nel fluido interstiziale del tumore mammario; l'espressione di PDGFB è associata a una malattia di alto grado e a una ridotta OS; promuove l'angiogenesi, il reclutamento dei periciti e la vascolarizzazione tumorale	154,271,274
TGFα	EGFR (ErbB1)	EGFR→Akt, MAPK (ERK)	Principale ligando autocrino per EGFR nel TNBC; l'asse TGFα-EGFR-Akt potenzia l'espressione di chemochine pro-infiammatorie (CXCL2); i macrofagi immunosoppressivi indotti da G-CSF secernono TGFα per promuovere la migrazione delle cellule di TNBC	136,161,161,275
TNFα	TNFR1 (TNFRSF1A), TNFR2 (TNFRSF1B)	NF-κB (canonica/non canonica), MAPK (p42/44, JNK, p38), PI3K/Akt, STAT3	Principale citochina pro-infiammatoria nel TME del TNBC; un loop di feedback positivo TNFR1/NF-κB/p-STAT3/HBXIP promuove la crescita tumorale; stimola la produzione di CXCL8, CCL2 e CCL5, guidando l'angiogenesi, la migrazione e l'invasione; up-regola PD-L1/2	110,148,208,276–278
TNFβ (LTα)	TNFR1, TNFR2; LTβR (come eterotrimerico LTα1β2)	NF-κB (canonica/non canonica)	Funzioni pleiotropiche che includono lo sviluppo e l'omeostasi del tessuto linfoide; la via di segnalazione di LTβR può avviare la cancerogenesi indotta dall'infiammazione	105,279

VEGF-A	VEGFR1 (FLT1), VEGFR2 (KDR), NRP-1	PI3K/Akt, MAPK, PLC γ , Wnt/ β -catenin (via NRP-1/GAPVD1)	TNBC presenta livelli intratumorali di VEGF significativamente più elevati rispetto al non-TNBC; promuove l'angiogenesi, la staminalità tumorale e la polarizzazione dei TAM in senso M2; correla con l'espressione di PD-1/PD-L1; è associato a una sopravvivenza più breve	280–286
--------	---	---	--	---------

Tabella III: pannello delle citochine analizzate. Per ciascuna citochina sono stati riportati il recettore, la via di segnale attivata e l'attività della citochina nel contesto del TNBC.

Il dosaggio è stato eseguito secondo le istruzioni del produttore. In breve, 25 µL di ciascun campione di plasma, standard o controllo di qualità sono stati incubati overnight (16–18 ore) a 4°C su un agitatore per piastre con microsfere fluorescenti magnetiche coniugate con anticorpi diretti contro ogni specifica citochina. Dopo 3 lavaggi con un separatore magnetico per piastre, i complessi sfera-analita sono stati incubati con 25 µL di anticorpo secondario biotinilato per 1 ora a temperatura ambiente su un agitatore per piastre, seguita da un'incubazione di 30 minuti con 25 µL di coniugato streptavidina-ficoeritrina. Dopo 3 lavaggi finali, 150 µL di sheath fluid sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e le piastre sono state lette allo strumento Luminex xMAP.

I dati di intensità media di fluorescenza (MFI) sono stati convertiti in concentrazioni di analita (pg/mL) utilizzando una curva di regressione logistica a 5 parametri (5-PL) adattata alla serie di diluizioni standard a sette punti. Tutti i campioni sono stati dosati in duplicato, e la media delle misurazioni in duplicato è stata utilizzata per l'analisi statistica. I controlli di qualità forniti dal produttore (a bassa e alta concentrazione) sono stati inclusi in ciascuna piastra per monitorare la variabilità inter-saggio. Le concentrazioni di analita al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLOQ) sono state assegnate a un valore pari alla metà della concentrazione minima rilevabile ($\text{minDC}/2$). I campioni di entrambi i bracci di trattamento sono stati randomizzati tra le piastre per minimizzare gli effetti batch, e tutti i dosaggi sono stati eseguiti da un singolo operatore in cieco rispetto agli outcome clinici e all'assegnazione del trattamento.

2.3 Analisi statistica

Gli outcome di sopravvivenza sono stati così definiti: distant disease free survival (DDFS), definita come l'intervallo di tempo dalla randomizzazione alla recidiva a distanza, a un secondo tumore invasivo primitivo (non mammario) o al decesso; overall survival (OS), definita come l'intervallo di tempo tra la randomizzazione e il decesso per qualsiasi causa.

Le caratteristiche clinico-patologiche analizzate sono state suddivise in continue e categoriche e sono riportate nella **Tabella V**.

La relazione tra le caratteristiche clinico-patologiche e l'espressione delle citochine circolanti è stata valutata sia per le variabili categoriche che per le variabili continue. Per le variabili categoriche la forza delle associazioni è stata misurata con il test di Mann-Whitney (per le variabili dicotomiche) e con il test di Kruskal-Wallis (per le variabili con più di 2 categorie) riportando i p-value (p), mentre per le variabili continue è stato utilizzato il test di correlazione di Spearman riportando p-value e ρ di Spearman (ρ_s).

La relazione tra l'espressione citochinica e gli outcome è stata valutata tramite regressione di Cox univariabile riportando hazard ratio (HR), intervalli di confidenza al 95% (95%CI) e p-value. Le citochine con un valore $p < 0,05$ nell'analisi univariabile sono state inserite in modelli di regressione di Cox multivariabili aggiustati per le covariate clinico-patologiche età, BMI categorico (a 4 categorie), stadio alla diagnosi, trattamento con carboplatino e TILs al basale. Ciascuna citochina è stata analizzata sia come variabile continua (trasformata in $\log_2$) sia come variabile dicotomica, utilizzando come cut-off la concentrazione mediana (valori superiori vs inferiori o uguali alla mediana).

Data la molteplicità delle citochine testate, i p-value delle analisi di Cox sono stati aggiustati utilizzando il metodo del False Discovery Rate (FDR) di Benjamini-Hochberg, con una soglia $FDR < 0.05$ considerata statisticamente significativa.

I forest plot sono stati utilizzati per visualizzare i rapporti di rischio dei modelli di Cox univariabili. Le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier sono state generate per i gruppi di rischio definiti dalle citochine e confrontate con il test log-rank.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando le funzioni dei pacchetti *survival* (versione 3.5-8) e *survminer* (versione 0.4.9) del software R 4.3.3.

Risultati

3.1 Caratteristiche della popolazione

Erano disponibili e sono stati analizzati i campioni ematici di 322 (69.1%) pazienti sul totale dei 466 pazienti inclusi nello studio A-BRAVE. Le caratteristiche clinico-patologiche della popolazione con profilo citochinico disponibile erano largamente rappresentative della popolazione generale dello studio (**Tabella IV**).

Caratteristiche al baseline delle pazienti secondo la disponibilità di campioni basali di citochine

Caratteristiche	Esclusi (n = 144)	Inclusi (n = 322)	Totale (n = 466)	p-value ¹
Strato, n (%)				0.49
Strato A	23 (16%)	60 (19%)	83 (18%)	
Strato B	121 (84%)	262 (81%)	383 (82%)	
Età (anni), Mediana (Q1, Q3)	52 (45, 61)	51 (42, 59)	52 (43, 60)	0.11
Gruppi d'età, n (%)				0.13
Età <50 aa	62 (43%)	63 (51%)	225 (48%)	
Età ≥50 aa	82 (57%)	159 (49%)	241 (52%)	
Stadio al baseline, n (%)				0.46
Stadio I-II	104 (73%)	243 (76%)	347 (75%)	
Stadio III	39 (27%)	77 (24%)	116 (25%)	
Non disponibile	1	2	3	
Grading istologico, n (%)				0.31
G1	3 (2.4%)	2 (0.7%)	5 (1.3%)	
G2	12 (9.7%)	32 (12%)	44 (11%)	
G3	109 (88%)	235 (87%)	344 (88%)	
Non disponibile	20	53	73	
HER2 IHC, n (%)				0.033
HER2 0	112 (78%)	216 (67%)	328 (71%)	
HER2 1+	22 (15%)	63 (20%)	85 (18%)	
HER2 2+	9 (6.3%)	42 (13%)	51 (11%)	
Non disponibile	1	1	2	
Ki-67 (%), Mediana (Q1, Q3)	50 (30, 75)	54 (25, 75)	50 (26, 75)	0.85
Non disponibile	15	28	43	
Baseline sTILs (%), Mediana (Q1, Q3)	10 (5, 28)	10 (5, 25)	10 (5, 25)	0.63
Non disponibile	36	43	79	

Caratteristiche	Esclusi (n = 144)	Inclusi (n = 322)	Totale (n = 466)	p-value ¹
sTILs (≥20% vs <20%), n (%)				0.43
Low TILs (<20%)	65 (60%)	180 (65%)	245 (63%)	
High TILs (≥20%)	43 (40%)	99 (35%)	142 (37%)	
Non disponibile	36	43	79	
PD-L1 (≥21 vs <21), n (%)				0.41
PD-L1 low (<21%)	93 (81%)	246 (84%)	339 (83%)	
PD-L1 high (≥21%)	22 (19%)	46 (16%)	68 (17%)	
Non disponibile	29	30	59	
Capecitabina post-neoadiuvante, n (%)	28 (23%)	62 (24%)	90 (23%)	0.91
Non disponibile	23	60	83	
Carboplatino, n (%)	32 (22%)	109 (34%)	141 (30%)	0.012
¹ Pearson's Chi-squared test; Wilcoxon rank sum test; Fisher's exact test				

Tabella IV: caratteristiche della popolazione inclusa nello studio di questo elaborato rispetto alla popolazione complessiva dello studio A-BRAVE.

3.2 Associazioni tra citochine e parametri clinico-patologici

La **Tabella V** riporta le associazioni tra l'espressione citochinica e le caratteristiche clinico-patologiche delle pazienti arruolate nello studio A-BRAVE.

	Age (continuous)	Setting (Stratum A vs B)	BMI 4 cat (unknown vs lean vs overweight vs obese)	BMI (lean vs overobese)	Stage (I vs II vs III)	Nodal status (negative vs positive)	Histotype	Histologic Grading (G1 vs G2 vs G3)	Estrogen Receptor (ER- negative vs ER- low)	BRCA1/2 (mutated vs WT/VUS vs unknown)	Carboplatin (no vs yes)	Capecitabine postneo (no vs yes)	RCB (12 vs 3)	TILs basal (5% increments)	TILs surgery Stratum B $\geq 10\%$ (low vs high)	TILs basal $\geq 30\%$ (low vs high)	TILs surgery Stratum B (5% increments)	PD-L1 $\geq 21\%$ (low vs high)
<i>sCD40L</i>	0.7338	0.4308	0.3307	0.0853	0.3496	0.8611	0.4994	0.72	0.5664	0.1861	0.5416	0.4106	0.6086	0.2144	0.5483	0.6994	0.2456	0.8573
<i>EGF</i>	0.9613	0.126	0.4519	0.1445	0.3153	0.6253	Decreased in DC vs LC and MetaC vs LC (0.0443)	0.2634	0.5022	0.9173	0.1433	0.3833	0.0822	0.5236	0.4374	0.7386	0.0697	0.4691
<i>Eotaxin</i>	0.0498; ps = 0.11	0.841	0.2021	0.4275	0.5906	0.3275	0.0593	0.424	0.9072	0.8646	0.4073	0.9388	0.8812	0.3084	0.4682	0.6659	0.9734	0.9069
<i>FGF-2</i>	0.0983	0.7612	0.7489	0.5368	0.1425	0.4628	0.3071	0.5276	0.3565	Decreased in unknown vs others (0.0346)	0.5646	0.6447	0.2378	0.2564	0.6184	0.4266	0.4945	0.6015
<i>FTL-3L</i>	0.7515	0.0734	0.19	0.9547	0.2475	0.647	0.5791	0.7116	0.6006	0.1986	0.5576	0.7403	0.2069	0.2831	0.7693	0.6528	0.5314	0.7601
<i>Fractalkine</i>	0.5868	0.9914	0.7365	0.5256	Increased in stage III-II vs I (0.0195)	0.1356	0.2906	0.9558	0.1112	0.3542	0.7861	0.9183	0.6106	0.108	0.1956	0.0583	0.6172	0.5766
<i>G-CSF</i>	0.7409	0.0031	0.2285	0.1133	0.2049	0.8537	0.7732	0.1891	0.8792	0.2016	0.1263	0.8141	0.8845	0.5553	0.3025	0.7516	0.3634	0.8414
<i>GM-CSF</i>	0.1867	0.889	0.891	0.786	0.0633	0.1746	0.4768	0.7481	0.4646	0.5941	0.922	0.0388	0.8524	0.121	0.1523	0.3886	0.9394	0.7558
<i>GROα</i>	0.1579	0.1403	0.8091	0.4961	0.8062	0.8357	0.4367	0.2237	0.9778	0.3922	0.2916	0.1303	0.8222	0.2267	0.8802	0.1448	0.3641	0.1924
<i>IFNα2</i>	0.3455	0.6906	0.4902	0.2696	0.4171	0.3316	0.12	0.5494	0.2359	0.9271	0.01	0.7464	0.392	0.9678	0.2896	0.5893	0.9912	0.3511
<i>IFNγ</i>	0.7933	0.6331	0.3225	0.2989	0.1001	0.1955	0.2656	0.7265	0.9183	0.5006	0.9642	0.7574	0.076	0.2018	0.0505	0.1685	0.0771	0.75
<i>IL1α</i>	0.4204	0.5675	0.6727	0.7838	0.0671	0.3287	0.2117	0.5448	0.0831	0.7918	0.2496	0.9061	0.6724	0.322	0.9748	0.5462	0.5121	0.8716
<i>IL1β</i>	0.026; ps = -0.13	0.4532	0.7667	0.3406	0.0757	0.3909	0.421	0.751	0.7257	0.1671	0.3755	0.8138	0.2215	0.2229	0.4266	0.3465	0.4498	0.7404
<i>IL1RA</i>	0.9218	0.2448	<<0.001	<<0.001	0.346	0.4075	0.3384	0.6644	0.2244	0.0689	0.2468	0.8614	0.8097	0.0759	0.8965	0.5542	0.7613	0.3156
<i>IL2</i>	0.2763	0.5577	0.3941	0.8434	0.0577	0.3384	0.4597	0.7745	0.5312	0.145	0.1769	0.916	0.5391	0.8058	0.1012	0.5224	0.2854	0.3382

<i>IL3</i>	0.6565	0.6011	0.4971	0.1811	0.2461	0.5234	0.8366	0.2349	0.1648	0.8044	0.4276	0.8731	0.6569	0.0199; $p_s = 0.19$	0.687	0.0675	0.8027	0.803
<i>IL4</i>	0.381	0.9158	0.8099	0.5076	0.1886	0.0486	0.1196	0.6546	0.4637	0.0611	0.2764	0.6978	0.9507	0.223	0.1728	0.2286	0.2761	0.8053
<i>IL5</i>	0.3606	0.5863	0.7714	0.6469	Increased in stage III vs IL-I (0.0268)	0.1433	0.6254	0.4805	0.0582	0.0577	0.4164	0.1038	0.8459	0.3207	0.4496	0.7721	0.8725	0.5592
<i>IL6</i>	0.9754	0.3229	0.0195	0.017	0.054	0.072	0.3134	0.9795	0.5177	0.2165	0.9119	0.9297	0.7973	0.1658	0.1187	0.4368	0.5064	0.8268
<i>IL7</i>	0.4566	0.0944	0.5496	0.1516	0.4447	0.6711	0.5595	0.4396	0.4902	0.3109	0.4064	0.7938	0.7436	0.3173	0.7499	0.2919	0.3069	0.98
<i>IL8</i>	0.682	0.2707	0.717	0.5011	0.1069	0.3311	Decreased in DC vs LC and A; Increased in LC vs MedC (0.0434)	0.863	0.3263	0.2242	0.0656	0.0916	0.7529	0.5115	0.09	0.427	0.025; $p_s = -0.15$	0.9265
<i>IL9</i>	0.088	0.2408	0.8187	0.4908	Increased in stage III vs II vs I (0.0016)	0.0498	0.3074	0.7947	0.3863	0.1443	0.5971	0.2643	0.2455	0.0905	0.29	0.3913	0.1328	0.8513
<i>IL10</i>	0.4815	0.9313	0.3535	0.1091	Increased in stage III vs IL-I (0.0282)	0.0271	0.4764	0.3762	0.9243	0.8532	0.2182	0.3476	0.9988	0.1149	0.6834	0.5324	0.7698	0.6183
<i>IL12p40</i>	0.1005	0.7655	0.1272	0.0172	0.5574	0.5463	0.9492	0.4509	0.5649	0.3078	0.1824	0.6411	0.2542	0.108	0.5141	0.5121	0.527	0.7725
<i>IL12p70</i>	0.0652	0.9793	0.8273	0.5677	0.0758	0.3546	0.0846	0.5259	0.2292	0.2543	0.2349	0.7798	0.6019	0.472	0.0308	0.3982	0.1122	0.4083
<i>IL13</i>	0.1337	0.5007	0.8933	0.523	Increased in stage III vs I (0.027)	0.0615	0.4125	0.893	0.4943	0.1395	0.9028	0.7711	0.5613	0.2006	0.9083	0.1694	0.6033	0.7
<i>IL15</i>	0.3501	0.5677	0.9424	0.5425	0.0817	0.354	0.8938	0.3332	0.2367	0.711	0.8789	0.9627	0.7684	0.6915	0.2449	0.671	0.633	0.1626
<i>IL17A</i>	0.1417	0.937	0.7865	0.7952	0.3055	0.5391	0.1642	0.4726	0.3766	0.1148	0.5284	0.7528	0.6966	0.2604	0.3593	0.5718	0.4271	0.4811
<i>IL17E/IL25</i>	0.0738	0.319	0.8311	0.9572	0.3582	0.2488	0.9327	0.993	0.6344	Decreased in unknown vs others (0.0271)	0.8529	0.4897	0.3256	0.2352	0.6588	0.2176	0.7063	0.862
<i>IL17F</i>	0.893	0.5184	0.8381	0.8953	0.7706	0.2197	0.5769	0.3817	0.1567	0.3261	0.9341	0.3121	0.1856	0.0662	0.9872	0.0219	0.4544	0.0639
<i>IL18</i>	0.5574	0.912	0.5053	0.1573	0.5705	0.7274	0.361	0.6899	0.6853	0.2388	0.2998	0.3063	0.5093	0.0065; $p_s = 0.16$	0.8628	0.0828	0.9499	0.3648

<i>IL22</i>	0.1433	0.7966	0.5135	0.7069	Increased in stage III-II vs I (0.0308)	0.4837	0.2184	0.4716	0.4694	0.984	0.2799	0.6799	0.6451	0.8696	0.7527	0.2573	0.8056	0.8368
<i>IL27</i>	0.9298	0.6007	0.2211	0.5565	0.8428	0.8954	0.5013	0.1321	0.7657	0.9225	0.6506	0.2721	0.9803	0.9219	0.4083	0.6576	0.4872	0.6002
<i>IP-10</i>	0.0164; $p_s = 0.13$	0.292	0.1148	0.0197	0.1437	0.7685	0.5533	0.1905	0.3101	0.6172	0.4226	0.0831	0.2269	0.3522	0.3983	0.3166	0.1775	0.5598
<i>MCP-1</i>	0.9687	0.9369	0.9094	0.8592	0.3279	0.8394	Decreased in DC vs AC and MetaC; in LC vs AC (0.0482)	0.2311	0.0614	0.3904	0.2005	0.0332	0.7266	0.772	0.2761	0.5098	0.1668	0.7966
<i>MCP-3</i>	0.3274	0.8188	0.9974	0.9189	0.186	0.148	Increased in LC vs all others except ICND (0.0279)	0.8185	0.5809	0.2669	0.2695	0.8773	0.7895	0.1679	0.2361	0.0596	0.4921	0.723
<i>M-CSF</i>	0.9999	0.3109	0.531	0.1605	0.3132	0.6876	0.2302	0.1967	0.9825	0.9679	0.2016	0.3827	0.0813	0.1569	0.0462	0.1879	0.1687	0.304
<i>MDC</i>	0.2392	0.013	0.0641	0.5212	0.9449	0.0779	0.3948	0.1912	0.5339	Decreased in WT/VUS vs mutated (0.0145)	0.9043	0.0252	0.5588	0.7525	0.3972	0.5512	0.2154	0.7907
<i>MIG</i>	0.0013; $p_s = 0.18$	0.3203	0.5877	0.4843	Increased in stage III vs I-II (0.0335)	0.2306	0.092	0.0557	0.9828	0.482	0.0962	0.7169	0.8961	0.4421	0.9929	0.3549	0.5949	0.4558
<i>MIP-1a</i>	0.2835	0.5836	0.3662	0.4615	0.0832	0.2372	0.344	0.596	0.7797	0.1675	0.3277	0.9188	0.5038	0.1912	0.3027	0.3558	0.4822	0.7861
<i>MIP-1b</i>	0.1955	0.3151	0.023	0.0051	0.8852	0.7735	0.4615	0.3017	0.4356	0.3239	0.4998	0.8456	0.7728	0.2975	0.813	0.4631	0.3044	0.6528
<i>PDGF-AA</i>	0.4589	0.8726	0.3002	0.1	0.5859	0.4136	0.2853	0.1889	0.5541	0.3965	0.0014	0.1855	0.1397	0.4667	0.3424	0.5379	0.0316; $p_s = -0.14$	0.2505
<i>PDGF-AB/BB</i>	0.909	0.6367	0.3227	0.1225	0.3813	0.5939	0.7459	0.0847	0.5053	0.2748	0.0222	0.0588	0.3686	0.2681	0.0226	0.4777	0.004; $p_s = -0.21$	0.8259
<i>TGFa</i>	0.2368	0.2245	0.8908	0.9516	0.0511	0.1527	0.6252	0.697	0.9679	0.4211	0.8379	0.4747	0.7473	0.0874	0.5017	0.1024	0.651	0.6747
<i>TNFa</i>	0.3246	0.6843	0.1523	0.0591	Increased in stage III-II vs I (0.0291)	0.1427	0.5409	0.3707	0.4081	0.7694	0.1573	0.2351	0.1615	0.2293	0.6041	0.2769	0.3617	0.8858
<i>TNFB</i>	0.2094	0.7237	0.5267	0.8566	0.0563	0.0746	Increased in LC vs all other except AC and NDIC (0.0338)	0.8893	0.2759	0.7194	0.8312	0.8659	0.2095	0.6307	0.4077	0.1254	0.3279	0.9886

<i>VEGF-A</i>	0.7832	0.4008	0.0715	0.0322	0.5213	0.8711	Decreased in DC vs AC and LC (0.0401)	0.6646	0.2731	0.9413	0.5246	0.0474	0.8289	0.1171	0.1206	0.212	0.0165; ρ_s = -0.16	0.2719
---------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	---	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	-------	-----------------------------	--------

Tabella V: la tabella riporta i p-value delle associazioni tra il pannello citochinico e le variabili clinico-patologiche della popolazione. In **rosso** sono evidenziate le associazioni statisticamente significative ($p < 0.05$) con correlazione positiva. In **verde** sono evidenziate le associazioni statisticamente significative ($p < 0.05$) con correlazione negativa. In **arancione** sono evidenziate le associazioni statisticamente significative ($p < 0.05$) che hanno trend diversi a seconda delle categorie confrontate. Per le variabili continue il trend aumenta o diminuisce al crescere del valore della variabile; per le variabili categoriche sono state espresse le differenze tra i vari gruppi (ove non specificato si intende aumentato/ridotto nel secondo gruppo nel titolo della colonna rispetto al primo). Per le variabili continue significative è stato infine riportato anche il valore della ρ di Spearman (ρ_s). BMI, body mass index; RCB, residual cancer burden; TILs, tumor-infiltrating lymphocytes; PD-L1, programmed death ligand 1; DC, ductal carcinoma; LC, lobular carcinoma; MetaC, metaplastic carcinoma; MedC, medullary carcinoma; AC, apocrine carcinoma; NDIC, non detailed infiltrating carcinoma; WT/VUS, wild type/variant of uncertain significance.

Tra queste, Eotassina, IP-10 e MIG sono risultati positivamente correlate all'età ($\rho_s = 0.11$, $p < 0.05$; $\rho_s = 0.13$, $p = 0.016$; $\rho_s = 0.18$, $p = 0.001$) (**Figura 6 – Pannelli A, B e C**). Per quanto riguarda l'IL-1 β è stata osservata una debole correlazione negativa ($\rho_s = -0.13$, $p = 0.026$) (**Figura 6 – Pannello D**). Rispetto al BMI, IP-10 risulta aumentato significativamente nelle pazienti sovrappeso ed obese ($p = 0.02$) (**Figura 7 – Pannello B**); anche IL-6 e VEGF-A aumentano in modo significativo nelle pazienti sovrappeso e obese rispetto alle pazienti normopeso ($p = 0.017$ e $p = 0.032$) (**Figura 7 – Pannelli A e D**). I livelli di TNF- α invece non differiscono significativamente tra pazienti normopeso e sovrappeso o obese ($p = 0.059$) (**Figura 7 – Pannello C**).

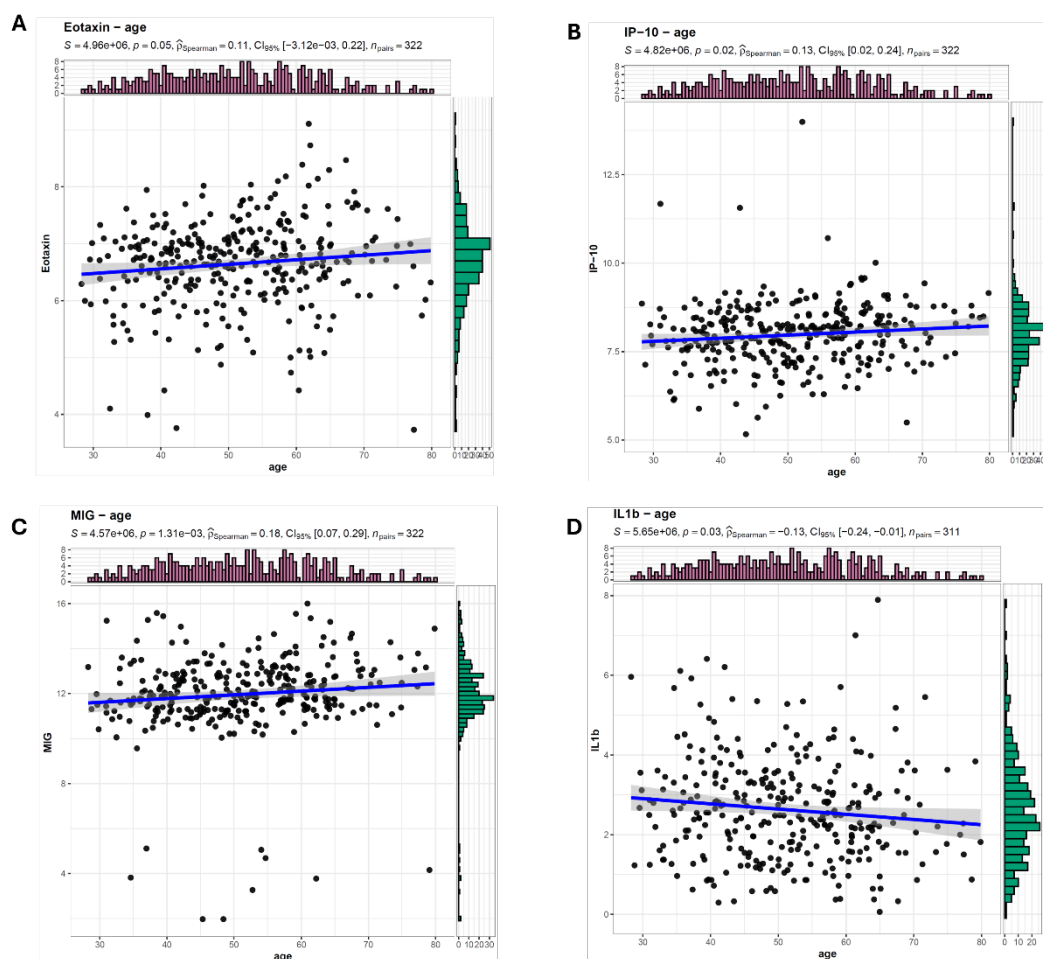


Figura 5: grafici a dispersione con retta di regressione ed istogrammi per la numerosità delle associazioni di IL-1 β (A), eotassina (B), IP-10 (C) e MIG (D) con l'età. Si può notare come eotassina, IP-10 e MIG abbiano un trend debolmente positivo con l'età, mentre IL-1 β abbia un trend debolmente negativo con l'età.

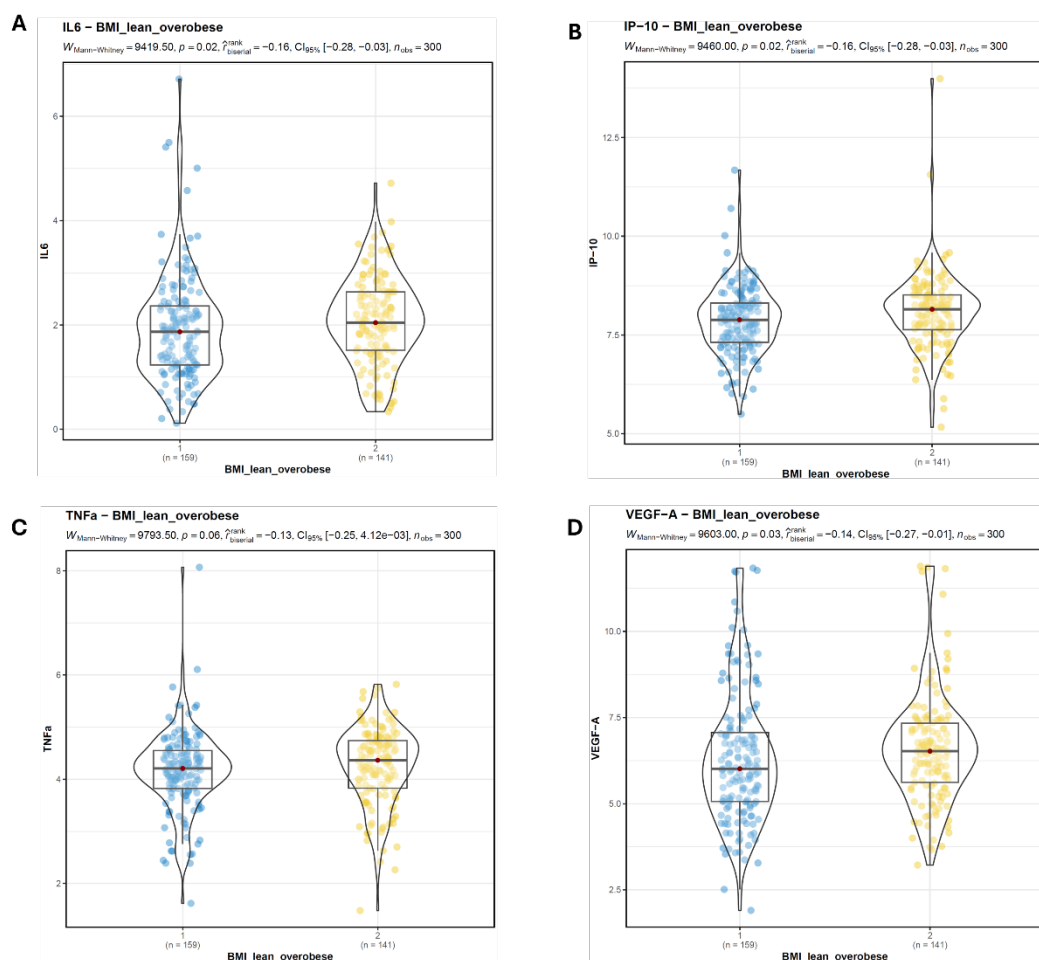


Figura 6: grafici a violino delle associazioni di IL-6 (A), IP-10 (B), TNF- α (C) e VEGF-A (D) con il BMI in 2 categorie. 1 = normopeso; 2 = sovrappeso/obeso.

È interessante notare l'associazione di alcune citochine con le variabili patologiche dei TILs. IL-3 e IL-18 correlano positivamente con la presenza di livelli sempre maggiori di TILs nel campione basale ($p = 0.02$, $\rho_s = 0.19$; $p = 0.0065$, $\rho_s = 0.16$, rispettivamente) (**Figura 8 – Pannelli A e B**), tuttavia questa associazione non si mantiene significativa se si categorizza la variabile in due gruppi con cut-off del 30% ($p = 0.0675$; $p = 0.0828$, rispettivamente); in questo caso l'unica citochina associata in maniera significativa è l'IL-17F ($p = 0.022$) (**Figura 8 – Pannello C**). Osservando invece i TILs nella popolazione dello strato B si assiste ad una correlazione debolmente negativa per i livelli di IL-8 ($p = 0.025$; $\rho_s = -0.15$), PDGF-AA ($p = 0.032$; $\rho_s = -0.14$), PDGF-AB/BB ($p = 0.004$; $\rho_s = -0.21$) e VEGF-A ($p = 0.017$; $\rho_s = -0.16$) (**Figura 9**); raggruppando invece i pazienti dello strato B in pazienti con TILs $<10\%$ e con TILs $\geq 10\%$ si hanno correlazioni negative con IL-12p70 ($p = 0.031$), M-CSF ($p = 0.046$) e PDGF-AB/BB ($p = 0.023$) (**Figura 10**).

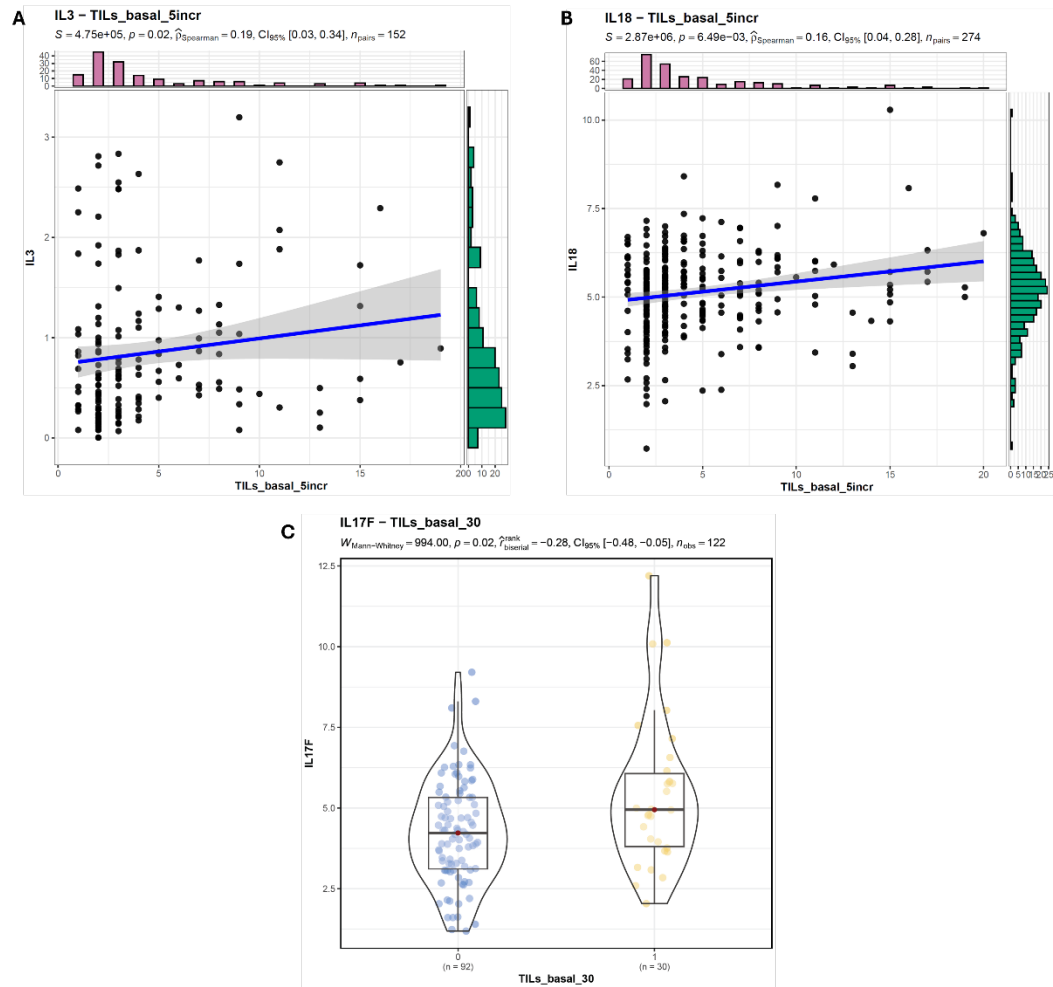


Figura 7: Pannelli A e B: grafici a dispersione con retta di regressione ed istogrammi per la numerosità delle associazioni di IL-3 (A) e IL-18 (B) con la quantità di TILs basali (espressa in incrementi del 5%). Pannello C: grafico a violino dell'associazione tra IL-17F e la quantità di TILs basali (categorizzata con cut-off del 30%). 0 = TILs < 30%; 1 = TILs ≥ 30%.

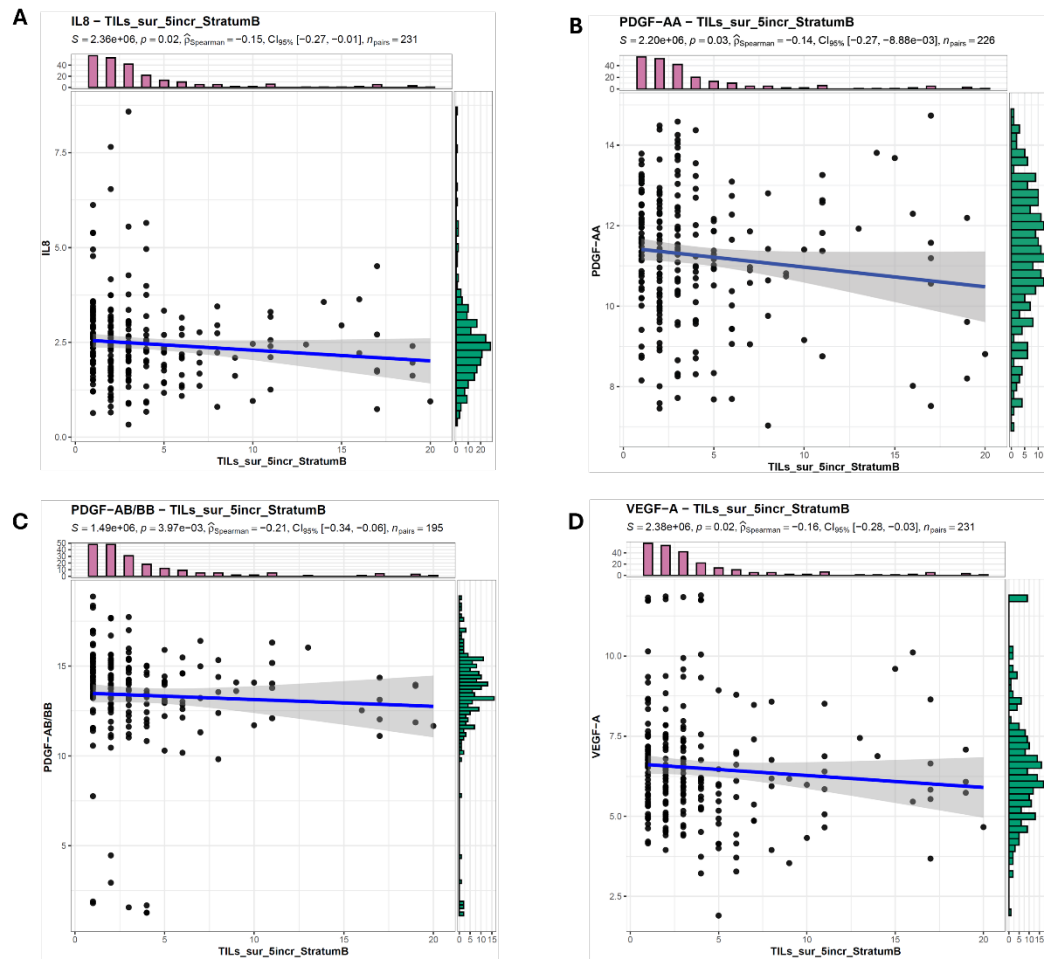


Figura 8: grafici a dispersione con retta di regressione ed istogrammi per la numerosità delle associazioni di IL-8 (A), PDGF-AA (B), PDGF-AB/BB (C) e VEGF-A (D) con la quantità di TILs nello strato B (espressa in incrementi del 5%).

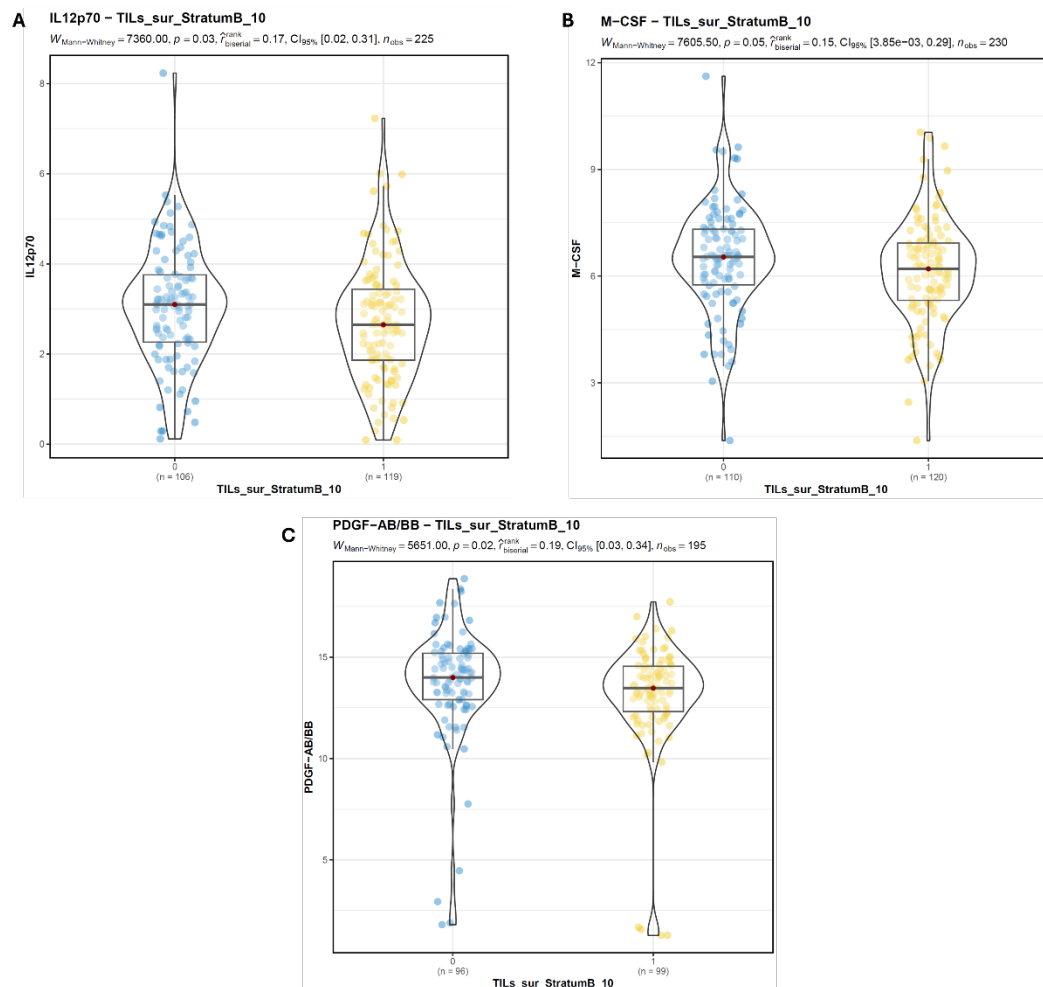


Figura 9: grafici a violino delle associazioni di IL-12p70 (A), M-CSF (B) e PDGF-AA/AB (C) con i TILs nello strato B suddivisi in 2 categorie con cut-off 10%. 0 = TILs < 10%; 1 = TILs ≥ 10%.

Rispetto invece allo stadio, diverse associazioni sono state riscontrate. Le citochine che mostrano livelli crescenti negli stadi più avanzati sono risultate: IL-9 ($p = 0.002$), IL-13 ($p = 0.027$), IL-5 ($p = 0.027$), IL-10 ($p = 0.028$), MIG ($p = 0.034$), Fractalkine ($p = 0.02$), IL-22 ($p = 0.031$) e TNF α ($p = 0.029$) (**Figura 11**).

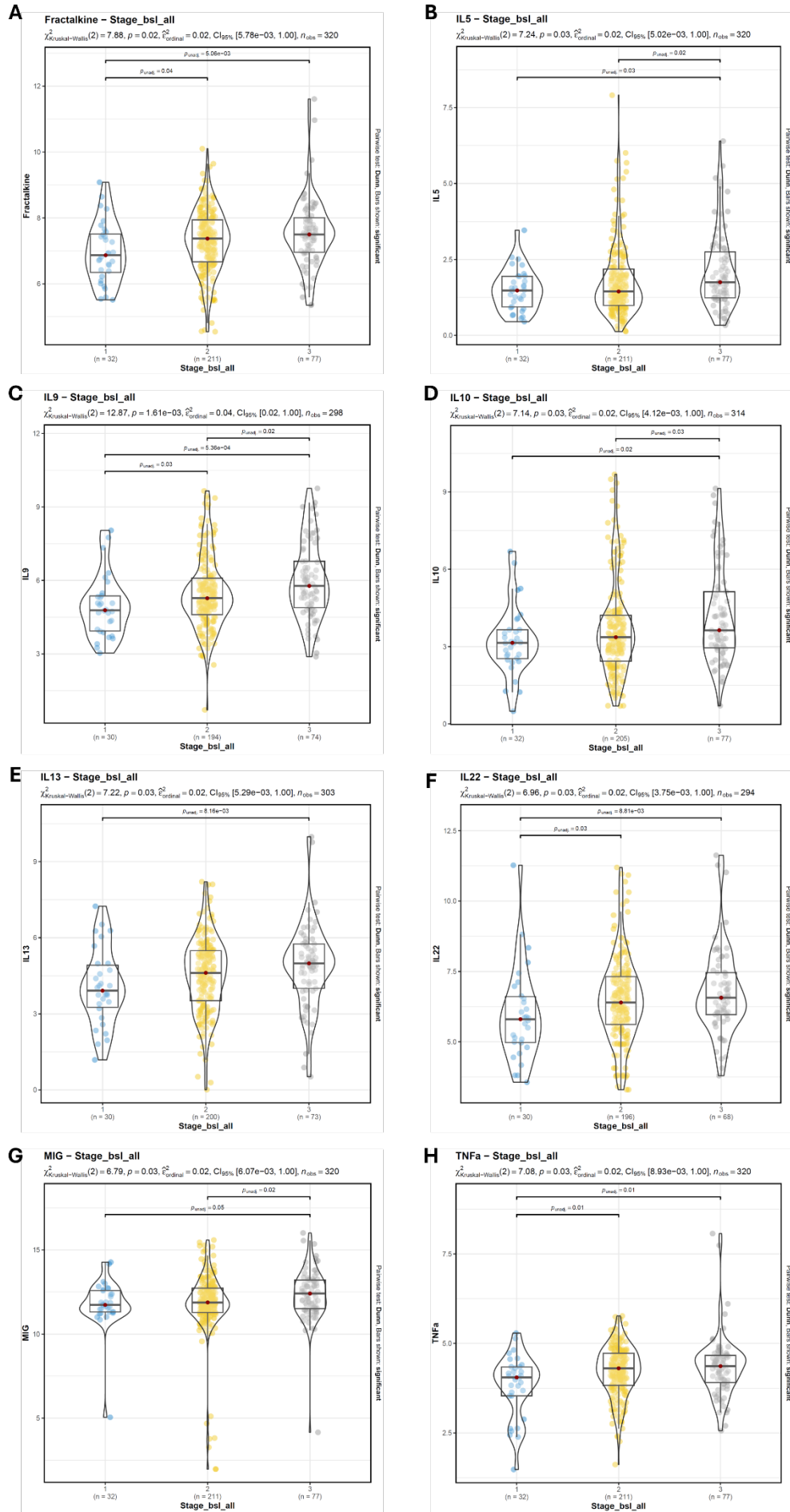


Figura 10: grafici a violino delle associazioni di fractalkine (A), IL-5 (B), IL-9 (C), IL-10 (D), IL-13 (E), IL-22 (F), MIG (G) e TNF- α (H) con lo stadio in 3 categorie. 1 = stadio I; 2 = stadio II; 3 = stadio III.

Per quanto riguarda le variabili grading istologico, espressione del recettore degli estrogeni, RCB (Residual Cancer Burden) e PD-L1 (cut-off 21%) non vi è associazione con nessuna citochina analizzata. Per molte delle citochine misurate (sCD40L, FTL-3L, GRO α , IFN α , IL-1 α , IL-2, IL-7, IL-15, IL-17 α , IL-27, TGF- α) non è stata dimostrata alcuna associazione statisticamente significativa con le caratteristiche clinico-patologiche.

3.3 Citochine e ruolo prognostico

È stato quindi valutato il significato prognostico dei livelli di citochine rispetto agli outcome di sopravvivenza DDFS e OS. Ad analisi univariate, l'espressione continua di alcune citochine si è dimostrata associata in modo statisticamente significativo ad un peggioramento degli outcome. In particolare, abbiamo dimostrato un rischio maggiore di recidiva a distanza o morte in pazienti con livelli crescenti di IL-3 (HR = 1.42, 95%CI 1.01-2.01, $p = 0.043$), IL-22 (HR = 1.15, 95%CI 1.01-1.31, $p = 0.032$), MIP-1 β (HR = 1.13, 95%CI 1.01-1.25, $p = 0.028$) e FTL-3L (HR = 1.18, 95%CI 1.05-1.32, $p = 0.006$) (**Figura 12**).

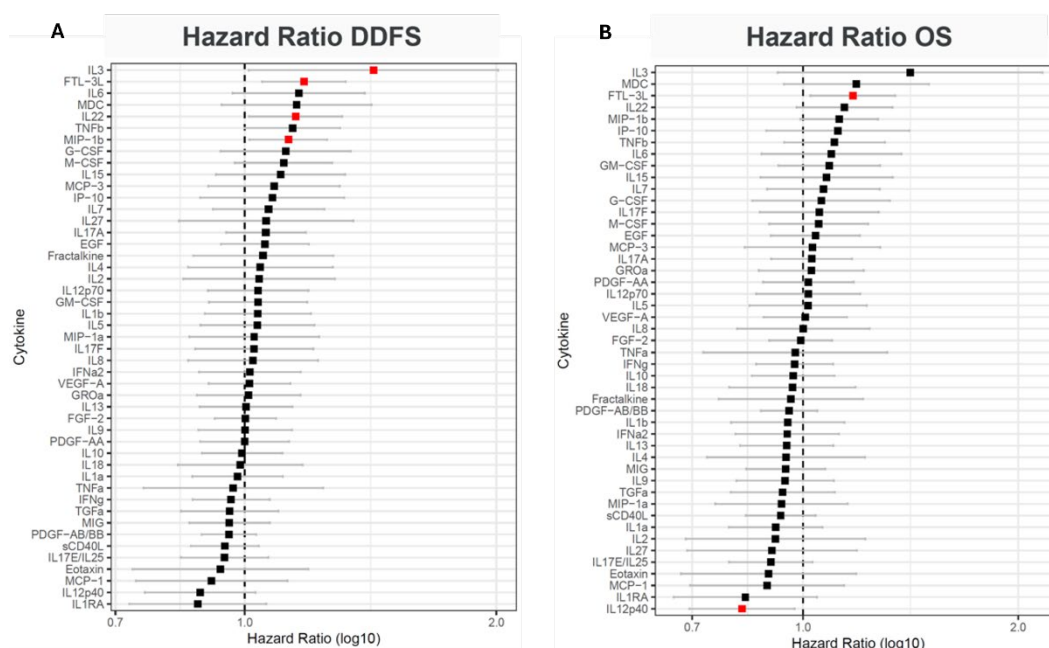


Figura 11: forest plot che mostrano Hazard Ratio della DDFS (A) e della OS (B) ottenuti dall'analisi univariabile. In rosso vengono evidenziati i valori statisticamente significativi ($p < 0.05$).

In termini di OS, solo FTL-3L ha mantenuto un valore prognostico negativo (HR = 1.17, 95%CI 1.02-1.35, $p = 0.021$), mentre più alti livelli di IL-12p40 si

associavano ad una riduzione del rischio di morte (HR = 0.82, 95%CI 0.69-0.97, $p = 0.023$) (**Figura 12 – Pannello B**).

Abbiamo successivamente esplorato le curve di sopravvivenza per DDFS e OS confrontando gruppi di pazienti con livelli di specifiche citochine superiori o inferiori alla mediana. Sono state osservate differenze significative in termini di DDFS in base a livelli di IL-3 e FTL-3L, con prognosi peggiore in caso di livelli superiori alla mediana ($p = 0.021$ e $p = 0.002$, rispettivamente) (**Figura 13 – Pannelli A e B**).

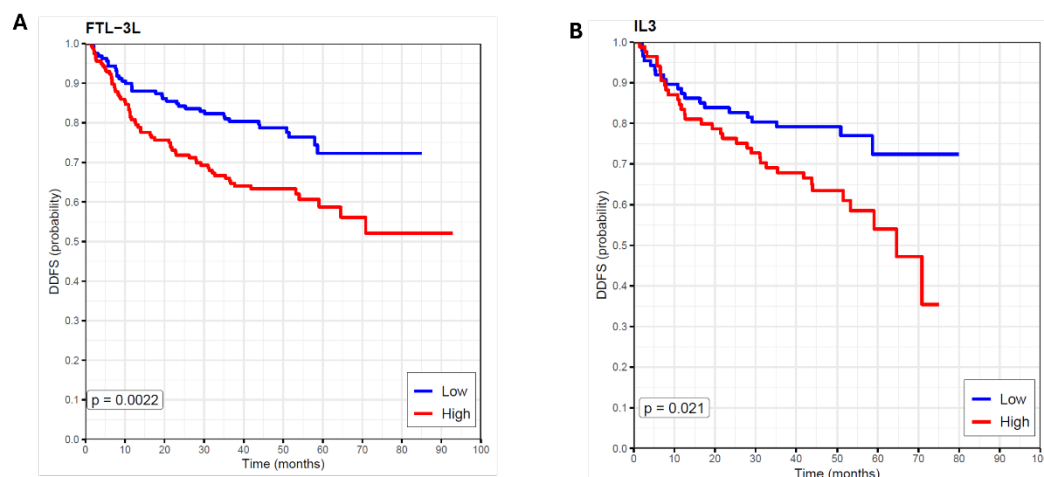


Figura 12: curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier con p-value del log-rank test per DDFS di FTL-3L (A) e IL-3 (B).

Per quanto riguarda le associazioni con sopravvivenza globale, valori superiori alla mediana di FTL-3L determinavano in modo significativo una prognosi peggiore rispetto a valori più bassi ($p = 0.007$) (**Figura 14**).

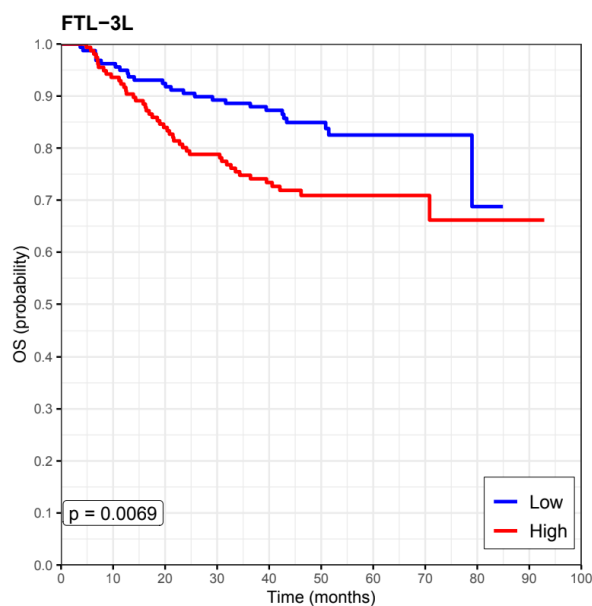


Figura 13: curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier con p-value del log-rank test per OS di FTL-3L.

Successivamente le associazioni delle citochine con gli outcome sono state analizzate con test multivariati, correggendo l'effetto misurato per alcune covariate clinico-patologiche. In termini di DDFS, maggiori livelli di FTL-3L e IL-22 confermano il risultato ottenuto con i test univariati dimostrando una prognosi sfavorevole (HR = 1.15 , 95%CI 1.004-1.33, p = 0.044; HR = 1.19, 95%CI 1.01-1.39, p = 0.036; rispettivamente). Al contrario livelli di IL-3 hanno dimostrato una correlazione prognostica non statisticamente significativa dopo correzione (p = 0.064), mentre MIP-1 β è risultato al limite della significatività statistica (p = 0.05).

Citochina	HR	95%CI	p-value
FTL-3L	1.15	1.004-1.33	0.044
IL-3	1.48	0.98-2.24	0.064
IL-22	1.19	1.01-1.39	0.036
MIP-1β	1,1377	1-1.29	0.05

Tabella VI: risultati delle analisi multivariate per DDFS dopo correzione per età, BMI in 4 categorie, TILs basali, stadio ed esposizione a carboplatino. In rosso sono evidenziate le associazioni statisticamente significative.

Considerando invece i risultati ottenuti per l'OS nei test multivariati, FTL-3L ha perso di significatività statistica dopo correzione ($p = 0.062$), mentre IL-12p40 si è confermata essere un fattore prognostico positivo ($HR = 0.81$, 95%CI 0.67-0.98, $p = 0.032$). Due nuove citochine sono emerse per il loro impatto prognostico negativo dopo correzione, ovvero IL-22 ($HR = 1.22$, 95%CI 1.01-1.47, $p = 0.04$) e MIP-1 β ($HR = 1.16$, 95%CI 1.01-1.34, $p = 0.038$).

Citochina	HR	95%CI	pvalue
FTL-3L	1.17	0.99-1.39	0.062
IL12p40	0.81	0.67-0.98	0.032
IL22	1.22	1.01-1.47	0.04
MIP-1b	1.16	1.01-1.34	0.038

Tabella VII: risultati delle analisi multivariate per OS dopo correzione per età, BMI in 4 categorie, TILs basali, stadio ed esposizione a carboplatino. In rosso sono evidenziate le associazioni statisticamente significative.

Nessuna delle citochine significative nel modello di rischio proporzionale di Cox multivariato è risultata significativa dopo categorizzazione rispetto alla mediana dei livelli di citochine.

Discussione

In questa analisi traslazionale esploratoria del profilo citochinico di campioni raccolti prospetticamente in pazienti randomizzati nell'ambito dello studio accademico di fase III A-BRAVE, abbiamo dimostrato come il profilo citochinico sia potenzialmente influenzato da numerose caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti. In aggiunta, alcune citochine plasmatiche hanno dimostrato un potenziale ruolo prognostico tendenzialmente negativo, nonostante una maggiore attivazione immunitaria sia generalmente associata ad un miglioramento della prognosi in TNBC.

Dalla valutazione dell'associazione tra le variabili clinico-patologiche dei pazienti inclusi nello studio e l'espressione citochinica abbiamo dimostrato alcune associazioni. Tra queste, Eotassina, IP-10 e MIG sono risultati positivamente correlate all'età, in linea con la nota associazione tra invecchiamento e shift infiammatorio sistemico (inflammaging)²⁸⁷⁻²⁹². IL-6 è risultata aumentata in modo significativo nelle pazienti sovrappeso e obese rispetto alle pazienti normopeso; ciò è coerente con il fatto che il tessuto adiposo dei pazienti sovrappeso e obesi secerne varie adipochine tra le quali la più significativa è l'IL-6^{293,294}. Anche l'aumento del VEGF-A nelle pazienti sovrappeso o obese è coerente con la maggior necessità di vascolarizzazione del tessuto adiposo in queste pazienti²⁹⁵⁻²⁹⁷. Per i livelli di TNF- α invece non vi è alcuna differenza significativa e ciò è probabilmente legato al fatto che i livelli di questa citochina sono generalmente elevati nei pazienti con TNBC^{105,276-278}. Il fatto che nella nostra casistica siano state confermate associazioni già note in letteratura tra profilo citochinico, età e BMI rappresenta un elemento a supporto dell'affidabilità delle misurazioni effettuate; al tempo stesso, suggerisce che alcune relazioni tra caratteristiche dell'ospite e stato infiammatorio sistemico siano mantenute anche nel contesto biologicamente complesso del TNBC.

Per quanto riguarda le associazioni prognostiche, il profilo di espressione di alcune citochine ha dimostrato di identificare pazienti a maggior rischio di recidiva. IL-3, pur essendo positivamente associata a maggiori livelli di TILs, è risultata associata a una prognosi sfavorevole in termini di sopravvivenza libera da malattia a distanza, sia quando analizzata come variabile continua sia quando valutata come variabile categorica. Tuttavia, tale impatto prognostico non è stato osservato in

termini di sopravvivenza globale ed ad analisi multivariabili per DDFS, ma non per OS, dove questo ruolo prognostico negativo è stato mantenuto. Questi dati sono coerenti con la letteratura disponibile: studi su modelli murini e in vitro di carcinoma mammario dimostrano che IL-3 correla con un ruolo antitumorale inducendo sia la proliferazione di linfociti Th1 sia stimolando i macrofagi del microambiente tumorale a produrre TNF- α causando ridotta vascolarizzazione tumorale^{298,299}, un quadro quindi coerente con gli aumentati livelli di TILs a livello locale che abbiamo osservato. Allo stesso tempo però maggiori livelli di IL-3 sono stati associati ad una sopravvivenza globale inferiore in diverse neoplasie tra cui il carcinoma mammario^{185,300,301}. Questa osservazione può esser associata alla promozione, attraverso il suo recettore (CD123) espresso dalle cellule tumorali, di transizione epitelio-mesenchimale, la proliferazione e la metastatizzazione^{185,186,302}. È possibile, dunque, che pazienti con livelli più elevati di IL-3 siano più propensi ad avere una malattia biologicamente più aggressiva rispetto ai pazienti con bassi livelli, nonostante questo si associ ad una infiammazione locale maggiore.

Dai risultati ottenuti, FTL-3L risulta avere un impatto prognostico negativo nella coorte di pazienti considerata in questo studio in termini sia di DDFS che di OS, associazione mantenuta come significativa con DDFS in analisi multivariabili. Questa citochina è fondamentale per lo sviluppo delle cellule dendritiche ed i suoi livelli correlano con l'attività di linfociti T infiltranti il tumore e con l'aumento di cellule NK³⁰³⁻³⁰⁵. Questo dato non è coerente con quanto noto in letteratura per tumori non-solidi come leucemia mieloide acuta^{306,307}, dove i livelli plasmatici di FTL-3L sono stati correlati ad un impatto prognostico positivo. A supporto di un ruolo prognostico indipendente, inoltre, nella nostra coorte, questa citochina non correla con alcuna delle variabili clinico-patologiche considerate. Ad oggi pertanto non vi sono studi sufficientemente robusti per il carcinoma mammario^{105,308}, e il nostro studio supporta analisi ulteriori volte a chiarirne il ruolo in TNBC.

Un'altra citochina che ha mostrato un impatto prognostico sfavorevole è IL-22. Questo risultato appare coerente con quanto riportato in letteratura^{243,309}. Dal punto di vista biologico, infatti, IL-22 è coinvolta in diversi processi rilevanti nel carcinoma mammario, tra cui infiammazione cronica, proliferazione cellulare e attivazione della via di segnalazione STAT3^{244,310}. Questa citochina è secreta dalle cellule Th22, una sottopopolazione linfocitaria presente nel microambiente tumorale del TNBC³¹⁰. Diversi studi hanno dimostrato che IL-22 può promuovere

la proliferazione cellulare e il processo di metastatizzazione in differenti tipologie tumorali, incluso il TNBC^{243,244,310–313}. Inoltre, è stato riportato che IL-22 può contribuire alla resistenza al paclitaxel, farmaco comunemente utilizzato nei regimi chemioterapici per il TNBC³¹⁰. Questi elementi sono coerenti con il fatto che, nel nostro studio, IL-22 sia risultata associata a una ridotta DDFS e, al tempo stesso, positivamente correlata a uno stadio più avanzato alla diagnosi. Tuttavia, l'associazione con uno stadio di malattia più avanzato non sembra spiegare completamente l'impatto prognostico di IL-22, che infatti si mantiene indipendente in analisi multivariabile sia per DDFS sia per OS.

MIP-1 β ha mostrato un ruolo prognostico negativo indipendente per DDFS e borderline per OS in analisi multivariate. In letteratura si osserva che questa chemochina agisce da importante attivatore e reclutatore di macrofagi tramite il recettore CCR5; tuttavia, nelle pazienti con carcinoma mammario i livelli di questo recettore sono marcatamente ridotti portando ad una ridotta risposta Th1²⁶⁹. Secondo altri studi invece in presenza di elevati livelli di MIP-1 β secreti dai macrofagi associati al tumore (TAMs) favorirebbe la proliferazione, la metastatizzazione e l'immunosoppressione stimolando la selezione di linfociti Treg^{270,314–316}.

Rispetto alle altre citochine trattate finora, IL-12p40 è l'unica ad aver mostrato, per livelli più alti, un impatto prognostico favorevole in termini di OS sia in analisi univariabile che in analisi multivariabile. Questo risultato è interessante perché allo stesso tempo i livelli di questa citochina correlavano con un BMI maggiore, che è un fattore di rischio associato a maggiore mortalità nel carcinoma mammario^{317–321}. Contrariamente ai nostri risultati, nel melanoma l'aumento dei livelli di questa citochina è stato associato ad un aumentato rischio di ricorrenza e ad una peggior sopravvivenza globale, tuttavia soltanto per gli stadi I e II³²²; invece, nel carcinoma colon rettale i livelli plasmatici di questa citochina sono stati correlati ad una maggior sopravvivenza globale³²³. In letteratura questa citochina è riconosciuta per avere un duplice effetto: da un lato promuove una risposta antitumorale stimolando la proliferazione di linfociti Th1, dall'altro compete con il legame di altre forme dell'IL-12 riducendo quindi l'attivazione linfocitaria¹⁴⁴. È possibile, dunque, che nelle pazienti incluse nel trial A-BRAVE sia prevalso l'effetto protettivo di questa citochina favorendo un miglior controllo della neoplasia da parte della risposta Th1.

Il lavoro presentato in questo elaborato si inserisce all'interno di un programma traslazionale più ampio dello studio A-BRAVE. In primo luogo, sono attualmente in corso le analisi dei livelli di citochine su campioni plasmatici raccolti nei successivi time-point previsti dallo studio. Questo permetterà di dimostrare l'esistenza di variazioni nel profilo citochinico associate alla risposta ai trattamenti. Sono inoltre previste analisi di profilazione metabolomica sugli stessi campioni plasmatici. In parallelo, stanno procedendo le analisi di RNA-seq sui campioni tissutali. Quest'ultima analisi permetterà un approccio integrato, capace di integrare valutazioni del profilo citochinico e le caratteristiche del microambiente tumorale. In questa prospettiva, diversi studi suggeriscono che l'applicazione di algoritmi di intelligenza artificiale e approcci di analisi multi-omica possa rappresentare uno strumento utile per integrare dati clinici, biologici e immunologici complessi³²⁴⁻³²⁷. Questo costituisce infatti l'obiettivo finale di questo programma, cioè lo sviluppo di uno score composito immuno-metabolico, in grado di integrare marcatori plasmatici e tissutali con potenziale valore prognostico e, possibilmente, predittivo del beneficio clinico associato al trattamento con avelumab.

Il nostro studio presenta alcune limitazioni. (I) Nonostante alcune citochine abbiano mostrato una significatività statistica nominale nelle analisi di regressione di Cox, nessuna di esse ha mantenuto la significatività dopo correzione per False Discovery Rate (FDR), non raggiungendo quindi la soglia prestabilita di significatività statistica ($FDR < 0,05$). Pertanto, questi risultati devono essere interpretati come puramente esplorativi e necessitano di validazione in coorti indipendenti. Tale risultato era in parte atteso, considerando l'elevato numero di citochine analizzate simultaneamente (47). Per ridurre il rischio di associazioni spurie e di effetti di confondimento, le analisi sono state condotte tenendo conto di caratteristiche clinico-patologiche rilevanti note. (II) riconosciamo limitazioni legate alla standardizzazione dell'uso delle citochine plasmatiche: non esiste infatti un consenso né sui valori soglia da utilizzare né su quali piattaforme siano effettivamente migliori per avere dei dosaggi affidabili⁸⁹. Inoltre, non esiste ad oggi un cut-off validato per categorizzare i livelli di espressione delle singole citochine. L'utilizzo di un valore mediano, esplorato nella nostra analisi, ha spesso mancato di dimostrare associazioni prognostiche, dimostrando come la granularità delle analisi citochiniche sia importante e non sempre cut-off arbitrari riflettano categorizzazioni biologicamente e clinicamente rilevanti. (III) L'interpretazione

biologica delle associazioni dimostrare rimane esplorativa, e complicata dalla valutazione di una singola citochina nel contesto di interazioni complesse e multiple che in realtà avvengono in network. In aggiunta, il ruolo funzionale delle citochine nel contesto tumorale rimane complesso da interpretare, poiché esse possono esercitare effetti pro-tumoral o anti-tumoral a seconda del contesto biologico, cellulare e immunologico in cui agiscono³²⁸.

Conclusioni

In questa analisi traslazionale dello studio randomizzato di fase III A-BRAVE, abbiamo dimostrato la fattibilità di raccolta e analisi del profilo citochinico dei pazienti con neoplasia TNBC, osservando associazioni esplorative significative sia con caratteristiche clinico-patologiche basali che prognostiche. Questi risultati sottolineano l'importanza di valutare il profilo citochinico dei pazienti con neoplasia TNBC, un ulteriore passo verso una oncologia di precisione.

Bibliografia

1. Bray F, Laversanne M, Sung H *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2024;**74**(3):229–63. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.
2. AIOM. *I Numeri Del Cancro in Italia 2025*. n.d. https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2025/12/2025_NDC_web.pdf.
3. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;**406**(6797):747–52. <https://doi.org/10.1038/35021093>.
4. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J *et al.* Breast cancer. *Nat Rev Dis Primer* 2019;**5**(1):66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>.
5. Vaz-Gonçalves L, Marquart-Wilson L, Protani MM *et al.* Capturing breast cancer subtypes in cancer registries: Insights into real-world incidence and survival. *J Cancer Policy* 2025;**44**:100567. <https://doi.org/10.1016/j.jcpo.2025.100567>.
6. Anagnostou V, Bardelli A, Chan TA *et al.* The status of tumor mutational burden and immunotherapy. *Nat Cancer* 2022;**3**(6):652–6. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00382-1>.
7. Yamaguchi H, Hsu JM, Yang WH *et al.* Mechanisms regulating PD-L1 expression in cancers and associated opportunities for novel small-molecule therapeutics. *Nat Rev Clin Oncol* 2022;**19**(5):287–305. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00601-9>.
8. García-Torralba E, Loi S, Salgado R *et al.* The immunology of human breast cancer. *Nat Rev Immunol* 18 May 2026:1–22. <https://doi.org/10.1038/s41577-026-01307-0>.
9. Kroemer G, Senovilla L, Galluzzi L *et al.* Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer. *Nat Med* 2015;**21**(10):1128–38. <https://doi.org/10.1038/nm.3944>.
10. Harris MA, Savas P, Virassamy B *et al.* Towards targeting the breast cancer immune microenvironment. *Nat Rev Cancer* 2024;**24**(8):554–77. <https://doi.org/10.1038/s41568-024-00714-6>.
11. Loizides S, Constantinidou A. *Frontiers | Triple Negative Breast Cancer: Immunogenicity, Tumor Microenvironment, and Immunotherapy*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1095839>.
12. Chatterjee A, Chakraborty A, Chatterjee S *et al.* Immunotherapy in triple-negative breast cancer: From molecular mechanisms to precision medicine—overcoming resistance and optimizing clinical outcomes. *Crit Rev Oncol Hematol* 2026;**221**:105174. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2026.105174>.
13. Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer Journey: Beginning, End, and Everything in Between. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* n.d.

https://ascopubs.org/doi/10.1200/EDBK_390464 (24 June 2026, date last accessed).

14. Cortazar P, Zhang L, Untch M *et al.* Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet* 2014;**384**(9938):164–72. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62422-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62422-8).
15. Spring LM, Fell G, Arfe A *et al.* Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy and Impact on Breast Cancer Recurrence and Survival: A Comprehensive Meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2020;**26**(12):2838–48. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-3492>.
16. Corti C, Li T, Martin AR *et al.* Impact of pathologic response and individual prognosis after neoadjuvant treatment in patients with early HER2+ and triple-negative breast cancer. *The Breast* 2026;**87**:104765. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2026.104765>.
17. Bianco N, Valenza C, Milano M *et al.* Treatment patterns and clinical outcomes in patients with triple-negative breast cancer (TNBC) and residual disease (RD) after neoadjuvant chemoimmunotherapy. *J Clin Oncol* 2026;**44**(16_suppl):e12678–e12678. https://doi.org/10.1200/JCO.2026.44.16_suppl.e12678.
18. Mason SR, Willson ML, Egger SJ *et al.* *Platinum-based Chemotherapy for Early Triple-negative Breast Cancer - Mason, SRE - 2023 | Cochrane Library*. n.d. <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD014805.pub2/full> (24 June 2026, date last accessed).
19. Minckwitz G von, Schneeweiss A, Loibl S *et al.* *Neoadjuvant Carboplatin in Patients with Triple-Negative and HER2-Positive Early Breast Cancer (GeparSixto; GBG 66): A Randomised Phase 2 Trial*. n.d. [https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(14\)70160-3/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(14)70160-3/abstract) (2 July 2026, date last accessed).
20. Shepherd JH, Ballman K, Polley MYC *et al.* CALGB 40603 (Alliance): Long-Term Outcomes and Genomic Correlates of Response and Survival After Neoadjuvant Chemotherapy With or Without Carboplatin and Bevacizumab in Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2022;**40**(12):1323–34. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01506>.
21. Geyer CE, Sikov WM, Huober J *et al.* *Long-Term Efficacy and Safety of Addition of Carboplatin with or without Veliparib to Standard Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer: 4-Year Follow-up Data from BrighTNess, a Randomized Phase III Trial*. n.d. [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(22\)00018-7/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(22)00018-7/fulltext) (2 July 2026, date last accessed).
22. Masuda N, Lee SJ, Ohtani S *et al.* Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. *N Engl J Med* 2017;**376**(22):2147–59. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1612645>.

23. Tutt ANJ, Garber JE, Kaufman B *et al.* Adjuvant Olaparib for Patients with BRCA1- or BRCA2-Mutated Breast Cancer. *N Engl J Med* 2021;**384**(25):2394–405. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2105215>.
24. Geyer CE, Garber JE, Gelber RD *et al.* Overall Survival in the OlympiA Phase III Trial of Adjuvant Olaparib in Patients with Germline Pathogenic Variants in BRCA1/2 and High-Risk, Early Breast Cancer. n.d. [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(22\)04165-5/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(22)04165-5/fulltext) (24 June 2026, date last accessed).
25. Kitano A, Ono M, Yoshida M *et al.* Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. *ESMO Open* 2017;**2**(2):e000150. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2016-000150>.
26. Cortes J, Rugo HS, Cescon DW *et al.* Pembrolizumab plus Chemotherapy in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2022;**387**(3):217–26. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2202809>.
27. Schmid P, Adams S, Rugo HS *et al.* Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2018;**379**(22):2108–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809615>.
28. Azambuja E de, Barrios CH, Bartsch R *et al.* Metastatic Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for Diagnosis, Treatment and Follow-Up†. n.d. [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(26\)00902-6/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(26)00902-6/fulltext) (10 June 2026, date last accessed).
29. Schmid P, Cortes J, Pusztai L *et al.* Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2020;**382**(9):810–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910549>.
30. Loibl S, André F, Bachelot T *et al.* Early Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for Diagnosis, Treatment and Follow-Up ☆. n.d. [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(23\)05104-9/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(23)05104-9/fulltext) (4 May 2026, date last accessed).
31. Schmid P, Cortes J, Dent R *et al.* Event-free Survival with Pembrolizumab in Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2022;**386**(6):556–67. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2112651>.
32. Schmid P, Cortes J, Dent RA *et al.* Neoadjuvant pembrolizumab or placebo plus chemotherapy followed by adjuvant pembrolizumab or placebo for high-risk early-stage TNBC: Final analysis results from the phase 3 KEYNOTE-522 study. *J Clin Oncol* 2026;**44**(16_suppl):507–507. https://doi.org/10.1200/JCO.2026.44.16_suppl.507.
33. Shah M, Osgood CL, Amatya AK *et al.* FDA Approval Summary: Pembrolizumab for Neoadjuvant and Adjuvant Treatment of Patients with High-Risk Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2022;**28**(24):5249–53. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-1110>.
34. Loibl S, Untch M, Burchardi N *et al.* A Randomised Phase II Study Investigating Durvalumab in Addition to an Anthracycline Taxane-Based Neoadjuvant

Therapy in Early Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Results and Biomarker Analysis of GeparNuevo Study. n.d.

[https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)31278-5/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)31278-5/fulltext) (24 June 2026, date last accessed).

35. Loibl S, Untch M, Huober J et al. Durvalumab in Combination With Neoadjuvant Chemotherapy in Early Triple-Negative Breast Cancer: Long-Term Analysis From the GeparNuevo Trial. *J Clin Oncol* 2026;**44**(17):1580–6. <https://doi.org/10.1200/JCO-25-02311>.
36. Mittendorf EA, Zhang H, Barrios CH et al. *Neoadjuvant Atezolizumab in Combination with Sequential Nab-Paclitaxel and Anthracycline-Based Chemotherapy versus Placebo and Chemotherapy in Patients with Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer (IMpassion031): A Randomised, Double-Blind, Phase 3 Trial.* n.d. [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)31953-X/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)31953-X/abstract) (24 June 2026, date last accessed).
37. Mittendorf EA, Assaf ZJ, Harbeck N et al. Peri-operative atezolizumab in early-stage triple-negative breast cancer: final results and ctDNA analyses from the randomized phase 3 IMpassion031 trial. *Nat Med* 2025;**31**(7):2397–404. <https://doi.org/10.1038/s41591-025-03725-4>.
38. Conte PF, Dieci MV, Bisagni G et al. A-BRAVE trial: a Phase 3 randomized trial with anti-PD-L1 avelumab in high-risk triple-negative early breast cancer patients. *Ann Oncol* Aug. 2025:S0923753425009251. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2025.08.005>.
39. National Cancer Institute (NCI). *A Randomized, Phase III Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of Pembrolizumab (MK-3475) as Adjuvant Therapy for Triple Receptor-Negative Breast Cancer With ≥ 1 CM Residual Invasive Cancer or Positive Lymph Nodes (ypN1mi, ypN1-3) After Neoadjuvant Chemotherapy*, Clinical trial registration no. NCT02954874. clinicaltrials.gov: clinicaltrials.gov, 2026. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02954874> (2 July 2026, date last accessed).
40. El Bairi K, Haynes HR, Blackley E et al. The tale of TILs in breast cancer: A report from The International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. *Npj Breast Cancer* 2021;**7**(1):150. <https://doi.org/10.1038/s41523-021-00346-1>.
41. Denkert C, Minckwitz G von, Brase JC et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy With or Without Carboplatin in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive and Triple-Negative Primary Breast Cancers. *J Clin Oncol* 2015;**33**(9):983–91. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.1967>.
42. Lam BM, Verrill C. Clinical Significance of Tumour-Infiltrating B Lymphocytes (TIL-Bs) in Breast Cancer: A Systematic Literature Review. *Cancers* 2023;**15**(4):1164. <https://doi.org/10.3390/cancers15041164>.
43. El Bairi K, Haynes HR, Blackley E et al. The tale of TILs in breast cancer: A report from The International Immuno-Oncology Biomarker Working Group.

- Npj Breast Cancer* 2021;**7**(1):150. <https://doi.org/10.1038/s41523-021-00346-1>.
44. Salgado R, Denkert C, Demaria S *et al.* *The Evaluation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Breast Cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014*. n.d.
[https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)31369-9/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)31369-9/fulltext) (10 June 2026, date last accessed).
 45. Dieci MV, Miglietta F, Guarneri V. Immune Infiltrates in Breast Cancer: Recent Updates and Clinical Implications. *Cells* 2021;**10**(2):223.
<https://doi.org/10.3390/cells10020223>.
 46. Krishnamurti U, Wetherilt CS, Yang J *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes are significantly associated with better overall survival and disease-free survival in triple-negative but not estrogen receptor-positive breast cancers. *Hum Pathol* 2017;**64**:7–12. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.01.004>.
 47. Loi S, Drubay D, Adams S *et al.* Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *J Clin Oncol* 2019;**37**(7):559–69.
<https://doi.org/10.1200/JCO.18.01010>.
 48. Tumor-infiltrating Treg, MDSC, and IDO expression associated with outcomes of neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. *Taylor Francis* n.d.
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15384047.2018.1450116> (22 June 2026, date last accessed).
 49. Loi S, Sirtaine N, Piette F *et al.* Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol* 2013;**31**(7):860–7. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.0902>.
 50. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ *et al.* Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Ann Oncol* 2014;**25**(8):1536–43. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu191>.
 51. Wang K, Xu J, Zhang T *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer predict the response to chemotherapy and survival outcome: A meta-analysis. *Oncotarget* published online 13 June 2016.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.9988>.
 52. García-Martínez E, Gil GL, Benito AC *et al.* Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2014;**16**(6):488.
<https://doi.org/10.1186/s13058-014-0488-5>.
 53. Denkert C, Minckwitz G von, Darb-Esfahani S *et al.* Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol* 2018;**19**(1):40–50. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30904-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30904-X).

54. Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann Oncol* 2014;**25**(3):611–8. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt556>.
55. Hwang HW, Jung H, Hyeon J *et al.* A nomogram to predict pathologic complete response (pCR) and the value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2018;**173**(2):255–66. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4981-x>.
56. Salgado R, Denkert C, Demaria S *et al.* *The Evaluation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Breast Cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014*. n.d. [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)31369-9/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)31369-9/fulltext) (11 June 2026, date last accessed).
57. Valenza C, Taurelli Salimbeni B, Santoro C *et al.* Tumor Infiltrating Lymphocytes across Breast Cancer Subtypes: Current Issues for Biomarker Assessment. *Cancers* 2023;**15**(3):767. <https://doi.org/10.3390/cancers15030767>.
58. Sharma P, Stecklein SR, Yoder R *et al.* Clinical and Biomarker Findings of Neoadjuvant Pembrolizumab and Carboplatin Plus Docetaxel in Triple-Negative Breast Cancer: NeoPACT Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2024;**10**(2):227–35. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2023.5033>.
59. SWOG Cancer Research Network. *Shorter Anthracycline-Free Chemo Immunotherapy Adapted to Pathological Response in Early Triple Negative Breast Cancer (SCARLET), A Randomized Phase III Study*, Clinical trial registration no. NCT05929768, with National Cancer Institute (NCI). clinicaltrials.gov: clinicaltrials.gov, 2025. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05929768> (1 July 2026, date last accessed).
60. Simon S, Labarriere N. PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? *Oncol Immunology* 2018;**7**(1):e1364828. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1364828>.
61. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB *et al.* *Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses*. n.d. [https://www.cell.com/immunity/abstract/S1074-7613\(07\)00328-7](https://www.cell.com/immunity/abstract/S1074-7613(07)00328-7) (22 June 2026, date last accessed).
62. Dill EA, Gru AA, Atkins KA *et al.* *PD-L1 Expression and Intratumoral Heterogeneity Across... : The American Journal of Surgical Pathology*. n.d. https://journals.lww.com/ajsp/abstract/2017/03000/pd_l1_expression_and_intratumoral_heterogeneity.5.aspx (11 June 2026, date last accessed).
63. Schmid P, Cortes J, Dent R *et al.* Overall Survival with Pembrolizumab in Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2024;**391**(21):1981–91. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2409932>.
64. Popovic L, Barroso-Sousa R, Saghir NSE *et al.* *Treatment Patterns and Clinical Outcomes According to PD-L1 Status in >2000 Patients with Early-Stage or Metastatic Triple-Negative Breast Cancer Treated in the Real-World Setting:*

- VANESSA Study Results. n.d. [https://www.thebreastonline.com/article/S0960-9776\(26\)00030-5/fulltext](https://www.thebreastonline.com/article/S0960-9776(26)00030-5/fulltext) (22 June 2026, date last accessed).
65. Lee S, Kim HY, Jung YJ et al. *Identification of Poor Prognostic Markers in Triple-Negative Breast Cancer Using Whole Exome Sequencing*. n.d. <https://doi.org/10.4048/jbc.2025.0165>.
 66. Tamem NN, Mabrouk SH, Shehabeldin ZA et al. *Immunohistochemical Study on Programmed Death Ligand 1... : Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. n.d. https://journals.lww.com/appliedimmunohist/abstract/2025/09000/immunohistochemical_study_on_programmed_death.8.aspx (22 June 2026, date last accessed).
 67. Pandey P, Trivedi K, Aggarwal R et al. To Assess the Predictive and Prognostic Role of PD-L1 and CD8 Following Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Indian J Surg Oncol* 2024;**16**(3):774–83. <https://doi.org/10.1007/s13193-024-02139-x>.
 68. Chen S, Wang RX, Liu Y et al. PD-L1 expression of the residual tumor serves as a prognostic marker in local advanced breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Int J Cancer* 2017;**140**(6):1384–95. <https://doi.org/10.1002/ijc.30552>.
 69. Huang X, Ding Q, Guo H et al. Comparison of three FDA-approved diagnostic immunohistochemistry assays of PD-L1 in triple-negative breast carcinoma. *Hum Pathol* 2021;**108**:42–50. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2020.11.004>.
 70. Erber R, Hartmann A. Understanding PD-L1 Testing in Breast Cancer: A Practical Approach. *Breast Care* 2020;**15**(5):481–90. <https://doi.org/10.1159/000510812>.
 71. Marletta S, Fusco N, Munari E et al. Atlas of PD-L1 for Pathologists: Indications, Scores, Diagnostic Platforms and Reporting Systems. *J Pers Med* 2022;**12**(7):1073. <https://doi.org/10.3390/jpm12071073>.
 72. Noske A, Steiger K, Ballke S et al. *Comparison of Assessment of Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Status in Triple-Negative Breast Cancer Biopsies and Surgical Specimens*, Original Research. published online 1 Apr. 2024. <https://doi.org/10.1136/jcp-2022-208637>.
 73. Ivanova M, Frascarelli C, Cerbelli B et al. PD-L1 testing in metastatic triple-negative breast cancer: Interobserver and interplatform reproducibility of CE-IVD assays for CPS and IC scores. *Hum Pathol* 2024;**144**:22–7. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2024.01.008>.
 74. Manson QF, Schrijver WAME, Hoeve ND ter et al. Frequent discordance in PD-1 and PD-L1 expression between primary breast tumors and their matched distant metastases. *Clin Exp Metastasis* 2018;**36**(1):29–37. <https://doi.org/10.1007/s10585-018-9950-6>.
 75. Holder AM, Dedeilia A, Sierra-Davidson K et al. Defining clinically useful biomarkers of immune checkpoint inhibitors in solid tumours. *Nat Rev Cancer* 2024;**24**(7):498–512. <https://doi.org/10.1038/s41568-024-00705-7>.

76. Qiu J, Qian D, Jiang Y *et al.* Circulating tumor biomarkers in early-stage breast cancer: characteristics, detection, and clinical developments. *Front Oncol* 2023;**13**:1288077. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1288077>.
77. Lin JX, Leonard WJ. *Fine-Tuning Cytokine Signals*. published online 26 Apr. 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041447>.
78. Rose-John S. *Interleukin-6 Family Cytokines*. published online 1 Feb. 2018. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028415>.
79. Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by yc family cytokines. *Nat Rev Immunol* 2009;**9**(7):480–90. <https://doi.org/10.1038/nri2580>.
80. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. *Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons*. n.d. [https://www.cell.com/immunity/abstract/S1074-7613\(19\)30142-6](https://www.cell.com/immunity/abstract/S1074-7613(19)30142-6) (23 June 2026, date last accessed).
81. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 2012;**119**(3):651–65. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-325225>.
82. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 2009;**9**(5):361–71. <https://doi.org/10.1038/nrc2628>.
83. Briukhovetska D, Dörr J, Endres S *et al.* Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nat Rev Cancer* 2021;**21**(8):481–99. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00363-z>.
84. Shalapour S, Karin M. Pas de Deux: Control of Anti-tumor Immunity by Cancer-Associated Inflammation. *Immunity* 2019;**51**(1):15–26. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.021>.
85. Waldmann TA. *Cytokines in Cancer Immunotherapy*. published online 1 Dec. 2018. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028472>.
86. Diakos CI, Charles KA, McMillan DC *et al.* Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol* 2014;**15**(11):e493–503. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70263-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70263-3).
87. Mouasni S, Tourneur L. FADD at the Crossroads between Cancer and Inflammation. *Trends Immunol* 2018;**39**(12):1036–53. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.10.005>.
88. Propper DJ, Balkwill FR. Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2022;**19**(4):237–53. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00588-9>.
89. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K *et al.* Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Adv Sci* 2021;**8**(15):2004433. <https://doi.org/10.1002/advs.202004433>.

90. Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol* 2013;**14**(6):e218–28. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70582-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70582-X).
91. Lippitz BE, Harris RA. Cytokine patterns in cancer patients: A review of the correlation between interleukin 6 and prognosis. *Oncolimmunology* 2016;**5**(5):e1093722. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1093722>.
92. Saif MSI, Sehgal K, Zhang Z et al. A cytokine-based serum proteomic score is a prognostic biomarker for immunotherapy in head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2025;**75**(1):30. <https://doi.org/10.1007/s00262-025-04271-1>.
93. Shaibu Z, Yang F, Chen Z et al. Investigating the correlation between cytokine levels and prognostic factors in advanced gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Res Commun* 2025;**45**:101005. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2025.101005>.
94. Liu H, Zhou C, Jiang H et al. *Frontiers | Prognostic Role of Serum Cytokines Level in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with Anti-PD-1 and Chemotherapy Combined Treatment*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1430301>.
95. Park JW, Chang HJ, Yeo HY et al. The relationships between systemic cytokine profiles and inflammatory markers in colorectal cancer and the prognostic significance of these parameters. *Br J Cancer* 2020;**123**(4):610–8. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0924-5>.
96. Maiorano BA, Schinzari G, Carbone C et al. *Frontiers | Prognostic Role of Circulating Cytokines and Inflammation Indexes for Avelumab Maintenance in Metastatic Urothelial Carcinoma*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1401214>.
97. Singh J, Sohal SS, Lim A et al. Cytokines expression levels from tissue, plasma or serum as promising clinical biomarkers in adenocarcinoma of the prostate: a systematic review of recent findings. *Ann Transl Med* 2019;**7**(11):245. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.05.31>.
98. Lambeck AJA, Crijns APG, Leffers N et al. Serum Cytokine Profiling as a Diagnostic and Prognostic Tool in Ovarian Cancer: A Potential Role for Interleukin 7. *Clin Cancer Res* 2007;**13**(8):2385–91. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1828>.
99. Tartour E, Pannetier C, Mathiot C et al. Prognostic value of cytokine and soluble Fcγ receptor assays in oncology. *Immunol Lett* Signals and Signal Processing in the Immune System, 1995;**44**(2):145–8. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(94\)00206-7](https://doi.org/10.1016/0165-2478(94)00206-7).
100. Kartikasari AER, Huertas CS, Mitchell A et al. *Frontiers | Tumor-Induced Inflammatory Cytokines and the Emerging Diagnostic Devices for Cancer Detection and Prognosis*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.692142>.

101. Ciurescu S, Buciu V, Șerban D *et al.* Role of Cytokines in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomedicines* 2025;**13**(9):2203. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13092203>.
102. Rosado-Sanz M, Martínez-Alarcón N, Abellán-Soriano A *et al.* Cytokine Networks in Triple-Negative Breast Cancer: Mechanisms, Therapeutic Targets, and Emerging Strategies. *Biomedicines* 2025;**13**(8):1945. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13081945>.
103. Kawaguchi K, Sakurai M, Yamamoto Y *et al.* Alteration of specific cytokine expression patterns in patients with breast cancer. *Sci Rep* 2019;**9**(1):2924. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39476-9>.
104. Saldajeno DP, Kawaoka S, Masuda N *et al.* Time-series blood cytokine profiles correlate with treatment responses in triple-negative breast cancer patients. *Br J Cancer* 2024;**130**(6):1023–35. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02527-0>.
105. Habel A, Bessaad M, stayoussef M *et al.* Comprehensive analysis of immune mediators in triple-negative breast cancer: Disclosing potential diagnostic and prognostic biomarkers. *Cytokine* 2026;**202**:157139. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2026.157139>.
106. Lopes AD, Galdino NAL, Figueiredo AB *et al.* Systemic immune mediators reflect tumour-infiltrating lymphocyte intensity and predict therapeutic response in triple-negative breast cancer. *Immunology* 2023;**169**(2):229–41. <https://doi.org/10.1111/imm.13627>.
107. Zhu J, Cheng J, Ma Y *et al.* The value of inflammation-related indicators in chemotherapy efficacy and disease-free survival of triple-negative breast cancer. *Eur J Med Res* 2025;**30**(1):77. <https://doi.org/10.1186/s40001-025-02328-6>.
108. Tang S, Zhang Y, Song L *et al.* High CXCL8 Expression Predicting Poor Prognosis in... : Anti-Cancer Drugs. n.d. https://journals.lww.com/anti-cancerdrugs/fulltext/2025/03000/high_cxcl8_expression_predicting_poor_prognosis_in.9.aspx (23 June 2026, date last accessed).
109. Hartman ZC, Poage GM, Hollander P den *et al.* Growth of Triple-Negative Breast Cancer Cells Relies upon Coordinate Autocrine Expression of the Proinflammatory Cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Res* 2013;**73**(11):3470–80. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4524-T>.
110. Liubomirski Y, Lerrer S, Meshel T *et al.* *Frontiers | Tumor-Stroma-Inflammation Networks Promote Pro-Metastatic Chemokines and Aggressiveness Characteristics in Triple-Negative Breast Cancer.* n.d. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00757>.
111. Chen X, Yang M, Yin J *et al.* Tumor-associated macrophages promote epithelial–mesenchymal transition and the cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer through CCL2/AKT/β-catenin signaling. *Cell Commun Signal* 2022;**20**(1):92. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00888-2>.

112. Al Sayegh H, Assi Z, Kanaan A et al. *Spandidos Publications: Oncology Reports*. n.d. <https://www.spandidos-publications.com/or> (23 June 2026, date last accessed).
113. Gandhi S, Deshmukh SK, Wu S et al. Chemokines as predictive biomarkers for immune checkpoint inhibitor (ICI) efficacy in triple negative breast cancer (TNBC). *J Clin Oncol* 2025;**43**(16_suppl):1106–1106. https://doi.org/10.1200/JCO.2025.43.16_suppl.1106.
114. Razis E, Kalogeras KT, Kotsantis I et al. *The Role of CXCL13 and CXCL9 in Early Breast Cancer*. n.d. [https://www.clinical-breast-cancer.com/article/S1526-8209\(19\)30667-6/abstract](https://www.clinical-breast-cancer.com/article/S1526-8209(19)30667-6/abstract) (23 June 2026, date last accessed).
115. Lv Y, Lv D, Lv X et al. *Frontiers | Immune Cell Infiltration-Based Characterization of Triple-Negative Breast Cancer Predicts Prognosis and Chemotherapy Response Markers*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.616469>.
116. Wang R, Chen S, Huang L et al. Monitoring Serum VEGF in Neoadjuvant Chemotherapy for Patients with Triple-Negative Breast Cancer: A New Strategy for Early Prediction of Treatment Response and Patient Survival. *The Oncologist* 2019;**24**(6):753–61. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0602>.
117. Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U et al. *Significantly Higher Levels of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Shorter Survival Times for Patients with Primary Operable Triple-Negative Breast Cancer*. n.d. [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)40853-3/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)40853-3/fulltext) (23 June 2026, date last accessed).
118. Castro-Espin C, Cairat M, Navionis AS et al. Prognostic role of pre-diagnostic circulating inflammatory biomarkers in breast cancer survival: evidence from the EPIC cohort study. *Br J Cancer* 2024;**131**(9):1496–505. <https://doi.org/10.1038/s41416-024-02858-6>.
119. Huang B, Lang X, Li X. *Frontiers | The Role of IL-6/JAK2/STAT3 Signaling Pathway in Cancers*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1023177>.
120. De La Cruz-Vargas JA, Gómez H, Talavera JE et al. Prognostic Relevance of Inflammatory Cytokines IL-6 and TNF-Alpha in Patients with Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr Oncol* 2025;**32**(6):344. <https://doi.org/10.3390/curroncol32060344>.
121. Waugh DJJ, Wilson C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res* 2008;**14**(21):6735–41. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4843>.
122. *Interleukin-8: A Chemokine at the Intersection of Cancer Plasticity, Angiogenesis, and Immune Suppression*. n.d. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107692>.
123. Hutajulu SH, Astari YK, Paramita DK et al. High IL-8 plasma levels at baseline are predictive of poor overall survival in breast cancer patients receiving chemotherapy. *BMC Res Notes* 2025;**18**(1):283. <https://doi.org/10.1186/s13104-025-07353-6>.

124. Panse J, Friedrichs K, Marx A *et al.* Chemokine CXCL13 is overexpressed in the tumour tissue and in the peripheral blood of breast cancer patients. *Br J Cancer* 2008;**99**(6):930–8. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604621>.
125. Sarfraz HR, Czerniecki BJ, Joshi U *et al.* Gut microbiome and serum cytokines as biomarkers for pathological complete response (pCR) and recurrence free survival in early locally advanced triple negative breast cancer (LA TNBC) receiving neoadjuvant chemotherapy (NA) and immune checkpoint blocker (ICI): Updated analysis from a pilot study. *J Clin Oncol* 2025;**43**(16_suppl):e12630–e12630. https://doi.org/10.1200/JCO.2025.43.16_suppl.e12630.
126. Yuan M, Yang H, Wu R *et al.* Triple-Negative Breast Cancer Cells Utilize IL8 and CXCL1 to Suppress NK Cells' Function and Facilitate Cancer Metastasis. *Adv Sci* n.d.;**n/a**(n/a):e75655. <https://doi.org/10.1002/adv.75655>.
127. Qian XL, Xu P, Zhang YQ *et al.* Increased number of intratumoral IL-17+ cells, a harbinger of the adverse prognosis of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2020;**180**(2):311–9. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05540-6>.
128. Shimura T, Shibata M, Gonda K *et al.* *Spandidos Publications: Oncology Letters*. n.d. <https://www.spandidos-publications.com/ol> (23 June 2026, date last accessed).
129. Popović M, Dedić Plavetić N, Vrbanc D *et al.* *Frontiers | Interleukin 17 in Early Invasive Breast Cancer*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1171254>.
130. Tsai YF, Huang CC, Lin YS *et al.* Interleukin 17A promotes cell migration, enhances anoikis resistance, and creates a microenvironment suitable for triple negative breast cancer tumor metastasis. *Cancer Immunol Immunother* 2021;**70**(8):2339–51. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-02867-x>.
131. Jin Y, Wang Y, Yang R. *Frontiers | Chemokine Ligand 2: Beyond Chemotaxis—a Multifaceted Role in Tumor Progression*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1685474>.
132. Soria G, Ben-Baruch A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Lett Inflammation and Cancer Special Issue*, 2008;**267**(2):271–85. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.018>.
133. Zhang W, Xu J, Fang H *et al.* Endothelial cells promote triple-negative breast cancer cell metastasis via PAI-1 and CCL5 signaling. *FASEB J* 2018;**32**(1):276–88. <https://doi.org/10.1096/fj.201700237RR>.
134. Alshehri MA, Alissa M. Integrative immunogenomic and experimental characterization reveals CXCL9, CXCL13, CCL5 and CD74 as key oncogenic drivers in breast cancer. *Mamm Genome* 2026;**37**(1):50. <https://doi.org/10.1007/s00335-026-10218-3>.
135. Al Sayegh H, Assi Z, Kanaan A *et al.* *Spandidos Publications: Oncology Reports*. n.d. <https://www.spandidos-publications.com/or> (17 June 2026, date last accessed).

136. Ignacio RMC, Gibbs CR, Lee ES *et al.* The TGF β -EGFR/Akt signaling axis plays a role in enhancing proinflammatory chemokines in triplenegative breast cancer cells. *Oncotarget* published online 29 June 2018. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25389>.
137. Liu X, Zhang L, Chen L. *Frontiers | Establishment of a Novel Cytokine-Related 8-Gene Signature for Distinguishing and Predicting the Prognosis of Triple-Negative Breast Cancer*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1189361>.
138. Yi J, Shuang Z, Zhong W *et al.* *Frontiers | Identification of Immune-Related Risk Characteristics and Prognostic Value of Immunophenotyping in TNBC*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.730442>.
139. Meng Y, Han ZX, Zhu J *et al.* *Spandidos Publications: Oncology Letters*. n.d. <https://www.spandidos-publications.com/ol> (23 June 2026, date last accessed).
140. Tian J, Li Y, Wang Z *et al.* Antigen-presenting CAFs orchestrate immunosuppressive niches via CXCL13-mediated immune cell infiltration dysregulation and prognostic stratification in triple-negative breast cancer. *Int Immunopharmacol* 2025;**162**:115193. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2025.115193>.
141. Hong CC, Yao S, McCann SE *et al.* Pretreatment levels of circulating Th1 and Th2 cytokines, and their ratios, are associated with ER-negative and triple negative breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2013;**139**(2):477–88. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2549-3>.
142. Jorgovanovic D, Song M, Wang L *et al.* Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res* 2020;**8**(1):49. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>.
143. Interferon signaling and outcomes in triple-negative breast cancer (TNBC) in FinXX, CALGB 40603 (Alliance) and real-world clinico-genomic data. *J Clin Oncol* n.d. https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2025.43.16_suppl.569 (17 June 2026, date last accessed).
144. Brombacher F, Kastelein RA, Alber G. *Novel IL-12 Family Members Shed Light on the Orchestration of Th1 Responses*. n.d. [https://www.cell.com/trends/immunology/abstract/S1471-4906\(03\)00067-X](https://www.cell.com/trends/immunology/abstract/S1471-4906(03)00067-X) (17 June 2026, date last accessed).
145. Colombo MP, Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* Cytokines in Tumor Immunity and Immunotherapy, 2002;**13**(2):155–68. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(01\)00032-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(01)00032-6).
146. Rosado-Sanz M, Martínez-Alarcón N, Meel MH *et al.* Tumor-educated macrophages promote cytokine-driven lung colonization in triple-negative breast cancer. *Oncol Immunology* 2026;**15**(1):2687381. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2026.2687381>.

147. Zhu Y, He Y, Chen C *et al.* *Frontiers | Development of a Nomogram Based on Serum Cytokine-Related Riskscore in Breast Cancer.* n.d.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1146463>.
148. Cai X, Cao C, Li J *et al.* Inflammatory factor TNF α promotes the growth of breast cancer via the positive feedback loop of TNFR1/NF κ B and/or p38/pSTAT3/HBXIP/TNFR1. *Oncotarget* published online 6 Apr. 2017.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16873>.
149. Pileczki V, Braicu C, Gherman CD *et al.* TNF- α Gene Knockout in Triple Negative Breast Cancer Cell Line Induces Apoptosis. *Int J Mol Sci* 2012;**14**(1):411–20.
<https://doi.org/10.3390/ijms14010411>.
150. Welte T, Zhang XHF. Interleukin-17 Could Promote Breast Cancer Progression at Several Stages of the Disease. *Mediators Inflamm* 2015;**2015**(1):804347.
<https://doi.org/10.1155/2015/804347>.
151. Brummer G, Fang W, Smart C *et al.* CCR2 signaling in breast carcinoma cells promotes tumor growth and invasion by promoting CCL2 and suppressing CD154 effects on the angiogenic and immune microenvironments. *Oncogene* 2020;**39**(11):2275–89. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1141-7>.
152. Schlom J, Jochems C, Gulley JL *et al.* The role of soluble CD40L in immunosuppression. *Oncol Immunology* 2013;**2**(1):e22546.
<https://doi.org/10.4161/onci.22546>.
153. Lopes AD, Galdino NAL, Figueiredo AB *et al.* Systemic immune mediators reflect tumour-infiltrating lymphocyte intensity and predict therapeutic response in triple-negative breast cancer. *Immunology* 2023;**169**(2):229–41.
<https://doi.org/10.1111/imm.13627>.
154. Espinoza JA, Jabeen S, Batra R *et al.* Cytokine profiling of tumor interstitial fluid of the breast and its relationship with lymphocyte infiltration and clinicopathological characteristics. *Oncol Immunology* 2016;**5**(12):e1248015.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1248015>.
155. Greenberg S, Rugo HS. *Triple-Negative Breast Cancer: Role of Antiangiogenic Agents : The Cancer Journal.* n.d.
https://journals.lww.com/journalppo/abstract/2010/02000/triple_negative_breast_cancer__role_of.6.aspx (16 June 2026, date last accessed).
156. Momenilandi M, Lévy R, Sobrino S *et al.* *FLT3L Governs the Development of Partially Overlapping Hematopoietic Lineages in Humans and Mice.* n.d.
[https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(24\)00404-5](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(24)00404-5) (16 June 2026, date last accessed).
157. Clappaert EJ, Kancheva D, Brughmans J *et al.* *Frontiers | Flt3L Therapy Increases the Abundance of Treg-Promoting CCR7+ cDCs in Preclinical Cancer Models.* n.d. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1166180>.
158. Tardáguila M, Mira E, García-Cabezas MA *et al.* CX3CL1 Promotes Breast Cancer via Transactivation of the EGF Pathway. *Cancer Res* 2013;**73**(14):4461–73. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3828>.

159. Bessaad M, Habel A, Hadj Ahmed M *et al.* Assessing serum cytokine profiles in inflammatory breast cancer patients using Luminex® technology. *Cytokine* 2023;**172**:156409. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2023.156409>.
160. Liu L, Wu Y, Zhang C *et al.* Cancer-associated adipocyte-derived G-CSF promotes breast cancer malignancy via Stat3 signaling. *J Mol Cell Biol* 2020;**12**(9):723–37. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjaa016>.
161. Hollmén M, Karaman S, Schwager S *et al.* G-CSF regulates macrophage phenotype and associates with poor overall survival in human triple-negative breast cancer. *Oncol Immunology* 2016;**5**(3):e1115177. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1115177>.
162. Lopes AD, Galdino NAL, Figueiredo AB *et al.* Systemic immune mediators reflect tumour-infiltrating lymphocyte intensity and predict therapeutic response in triple-negative breast cancer. *Immunology* 2023;**169**(2):229–41. <https://doi.org/10.1111/imm.13627>.
163. Ghirelli C, Reyat F, Jeanmougin M *et al.* Breast Cancer Cell–Derived GM-CSF Licenses Regulatory Th2 Induction by Plasmacytoid Predendritic Cells in Aggressive Disease Subtypes. *Cancer Res* 2015;**75**(14):2775–87. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2386>.
164. Malone MK, Smrekar K, Park S *et al.* Cytokines secreted by stromal cells in TNBC microenvironment as potential targets for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2020;**21**(6):560–9. <https://doi.org/10.1080/15384047.2020.1739484>.
165. Yan WL, Shen KY, Tien CY *et al.* Recent Progress in GM-CSF-Based Cancer Immunotherapy. *Immunotherapy* 2017;**9**(4):347–60. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0141>.
166. Yang C, Yu H, Chen R *et al.* *Spandidos Publications: International Journal of Oncology*. n.d. <https://www.spandidos-publications.com/ijo> (17 June 2026, date last accessed).
167. Yang C, Yu H, Chen R *et al.* *Spandidos Publications: International Journal of Oncology*. n.d. <https://www.spandidos-publications.com/ijo> (17 June 2026, date last accessed).
168. Fischer P, Schmid M, Ohradanova-Repic A *et al.* Molecular features of TNBC govern heterogeneity in the response to radiation and autophagy inhibition. *Cell Death Dis* 2025;**16**(1):540. <https://doi.org/10.1038/s41419-025-07873-w>.
169. Lopes AD, Galdino NAL, Figueiredo AB *et al.* Systemic immune mediators reflect tumour-infiltrating lymphocyte intensity and predict therapeutic response in triple-negative breast cancer. *Immunology* 2023;**169**(2):229–41. <https://doi.org/10.1111/imm.13627>.
170. Singh S, Kumar S, Srivastava RK *et al.* Loss of ELF5–FBXW7 stabilizes IFNGR1 to promote the growth and metastasis of triple-negative breast cancer through interferon- γ signalling. *Nat Cell Biol* 2020;**22**(5):591–602. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0495-y>.

171. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM *et al.* *Frontiers | Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion*. n.d.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>.
172. Liu F, Li L, Lan M *et al.* Key Factor Regulating Inflammatory Microenvironment, Metastasis, and Resistance in Breast Cancer: Interleukin-1 Signaling. *Mediators Inflamm* 2021;**2021**(1):7785890.
<https://doi.org/10.1155/2021/7785890>.
173. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2010;**10**(2):89–102. <https://doi.org/10.1038/nri2691>.
174. Baker KJ, Houston A, Brint E. *Frontiers | IL-1 Family Members in Cancer; Two Sides to Every Story*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01197>.
175. Malik A, Kanneganti TD. Function and regulation of IL-1 α in inflammatory diseases and cancer. *Immunol Rev* 2018;**281**(1):124–37.
<https://doi.org/10.1111/imr.12615>.
176. Zhang W, Borchering N, Kolb R. *IL-1 Signaling in Tumor Microenvironment*. 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38315-2_1.
177. Kuan EL, Ziegler SF. A tumor–myeloid cell axis, mediated via the cytokines IL-1 α and TSLP, promotes the progression of breast cancer. *Nat Immunol* 2018;**19**(4):366–74. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0066-6>.
178. Dúcka M, Kučeríková M, Trčka F *et al.* c-Myb interferes with inflammatory IL1 α -NF- κ B pathway in breast cancer cells. *Neoplasia* 2021;**23**(3):326–36.
<https://doi.org/10.1016/j.neo.2021.01.002>.
179. Toney NJ, Opdenaker LM, Frerichs L *et al.* B cells enhance IL-1 beta driven invasiveness in triple negative breast cancer. *Sci Rep* 2025;**15**(1):2211.
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-86064-1>.
180. Wilson BE, Shen Q, Cescon DW *et al.* *Frontiers | Exploring Immune Interactions in Triple Negative Breast Cancer: IL-1 β Inhibition and Its Therapeutic Potential*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1086163>.
181. Scordamaglia D, Talia M, Cirillo F *et al.* Interleukin-1 β mediates a tumor-supporting environment prompted by IGF1 in triple-negative breast cancer (TNBC). *J Transl Med* 2025;**23**(1):660. <https://doi.org/10.1186/s12967-025-06730-w>.
182. Di Mitri D, Toso A, Chen JJ *et al.* Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer. *Nature* 2014;**515**(7525):134–7.
<https://doi.org/10.1038/nature13638>.
183. Fang Z, Jiang J, Zheng X. Interleukin-1 receptor antagonist: An alternative therapy for cancer treatment. *Life Sci* 2023;**335**:122276.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122276>.
184. Nelson BH. IL-2, Regulatory T Cells, and Tolerance. *J Immunol* 2004;**172**(7):3983–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.7.3983>.

185. Podolska MJ, Grützmann R, Pilarsky C *et al.* *Frontiers | IL-3: Key Orchestrator of Inflammation*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1411047>.
186. Sarcinella A, Kholia S, Femminò S *et al.* IL-3/STAT5/miR-155-5p axis supports stem-related pathway reprogramming in TNBC. *Breast Cancer Res* 2025;**27**(1):195. <https://doi.org/10.1186/s13058-025-02143-1>.
187. Nagai S, Toi M. Interleukin-4 and breast cancer. *Breast Cancer* 2000;**7**(3):181–6. <https://doi.org/10.1007/BF02967457>.
188. Venmar KT, Carter KJ, Hwang DG *et al.* IL4 Receptor ILR4 α Regulates Metastatic Colonization by Mammary Tumors through Multiple Signaling Pathways. *Cancer Res* 2014;**74**(16):4329–40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0093>.
189. Keegan AD, Leonard WJ, Zhu J. Recent advances in understanding the role of IL-4 signaling. *Fac Rev* 2021;**10**:71. <https://doi.org/10.12703/r/10-71>.
190. Little AC, Pathanjeli P, Wu Z *et al.* *Frontiers | IL-4/IL-13 Stimulated Macrophages Enhance Breast Cancer Invasion Via Rho-GTPase Regulation of Synergistic VEGF/CCL-18 Signaling*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00456>.
191. Majumdar B, Dolui B, Basu A. Investigation of the effect of macrophage and epithelial cell interaction in the progression of different subtypes of breast cancer. *J Clin Oncol* 2024;**42**(23_suppl):10–10. https://doi.org/10.1200/JCO.2024.42.23_suppl.10.
192. Yu CT, Zhao X, Marchese E *et al.* Type 2 cytokines in breast epithelial homeostasis. *J Clin Oncol* 2026;**44**(16_suppl):e12588–e12588. https://doi.org/10.1200/JCO.2026.44.16_suppl.e12588.
193. Blomberg OS, Spagnuolo L, Garner H *et al.* *IL-5-Producing CD4+ T Cells and Eosinophils Cooperate to Enhance Response to Immune Checkpoint Blockade in Breast Cancer*. n.d. [https://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108\(22\)00561-X](https://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108(22)00561-X) (17 June 2026, date last accessed).
194. Kettner NM, Bui TN, Navarro-Yepes J *et al.* IL-6 predicts CDK4/6 inhibitor resistance, identifying STAT3 as a target in HR + /HER2-negative metastatic breast cancer. *Npj Precis Oncol* 2025;**9**(1):260. <https://doi.org/10.1038/s41698-025-01041-1>.
195. S RJ. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *PubMed* n.d. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23136552/> (15 June 2026, date last accessed).
196. Kim G, Ouzounova M, Quraishi AA *et al.* SOCS3-mediated regulation of inflammatory cytokines in PTEN and p53 inactivated triple negative breast cancer model. *Oncogene* 2015;**34**(6):671–80. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.4>.
197. Osuala KO, Sameni M, Shah S *et al.* IL-6 signaling between ductal carcinoma in situ cells and carcinoma-associated fibroblasts mediates tumor cell growth

- and migration. *BMC Cancer* 2015;**15**(1):584. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1576-3>.
198. Tang JC, Shen GB, Wang SM et al. IL-7 inhibits tumor growth by promoting T cell-mediated antitumor immunity in Meth A model. *Immunol Lett* 2014;**158**(1):159–66. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.12.019>.
 199. Lin J, Zhu Z, Xiao H et al. *The Role of IL-7 in Immunity and Cancer*, Reviews. 1 Mar. 2017. <https://ar.iijournals.org/content/37/3/963> (17 June 2026, date last accessed).
 200. Lee KJ, Choi D, Tae N et al. *IL-7-Primed Bystander CD8 Tumor-Infiltrating Lymphocytes Optimize the Antitumor Efficacy of T Cell Engager Immunotherapy*. n.d. [https://www.cell.com/cell-reports-medicine/abstract/S2666-3791\(24\)00259-3](https://www.cell.com/cell-reports-medicine/abstract/S2666-3791(24)00259-3) (17 June 2026, date last accessed).
 201. Sacco JJ, Broomfield A, Desbois M et al. Effect of IL7 on ImmTAC-mediated killing by T cells in vitro and T-cell fitness in patients. *J Clin Oncol* 2026;**44**(16_suppl):2662–2662. https://doi.org/10.1200/JCO.2026.44.16_suppl.2662.
 202. Fernando RI, Castillo MD, Litzinger M et al. IL-8 Signaling Plays a Critical Role in the Epithelial–Mesenchymal Transition of Human Carcinoma Cells. *Cancer Res* 2011;**71**(15):5296–306. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0156>.
 203. Liubomirski Y, Lerrer S, Meshel T et al. *Frontiers | Notch-Mediated Tumor-Stroma-Inflammation Networks Promote Invasive Properties and CXCL8 Expression in Triple-Negative Breast Cancer*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00804>.
 204. Bick F, Blanchetot C, Lambrecht BN et al. A reappraisal of IL-9 in inflammation and cancer. *Mucosal Immunol* 2025;**18**(1):1–15. <https://doi.org/10.1016/j.mucimm.2024.10.003>.
 205. Wickman E, Mamonkin M. *To the Nines: IL-9 Boosts T Cell Function*. n.d. [https://www.cell.com/immunity/abstract/S1074-7613\(25\)00562-X](https://www.cell.com/immunity/abstract/S1074-7613(25)00562-X) (17 June 2026, date last accessed).
 206. Do-Thi VA, Park SM, Park SM et al. IL9 Polarizes Macrophages to M1 and Induces the Infiltration of Antitumor Immune Cells via MIP-1 and CXCR3 Chemokines. *Cancer Res Commun* 2023;**3**(1):80–96. <https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-22-0246>.
 207. Zheng N, Lu Y. Targeting the IL-9 pathway in cancer immunotherapy. *Hum Vaccines Immunother* 2020;**16**(10):2333–40. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1710413>.
 208. Hassan AFF, Kheraldine H, Abujamous L et al. *Frontiers | Inflammation-Associated Drug Resistance and Tumor Growth in TNBC*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1623137>.
 209. Saraiva M, O’Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010;**10**(3):170–81. <https://doi.org/10.1038/nri2711>.

210. Mirlekar B. Tumor promoting roles of IL-10, TGF- β , IL-4, and IL-35: Its implications in cancer immunotherapy. *Sage Open Med* 2022;**10**:20503121211069012. <https://doi.org/10.1177/20503121211069012>.
211. Hamidullah, Changkija B, Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;**133**(1):11–21. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1855-x>.
212. Zhang C, Liu W, Yang P et al. *Frontiers | Dual Roles of Innate Immune Cells and Cytokines in Shaping the Breast Cancer Microenvironment*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1654947>.
213. Yang C, He L, He P et al. Increased drug resistance in breast cancer by tumor-associated macrophages through IL-10/STAT3/bcl-2 signaling pathway. *Med Oncol* 2015;**32**(2):14. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0352-6>.
214. Wu T, Liao Y. *Frontiers | Roles of Tumor-Associated Macrophages in Triple-Negative Breast Cancer Progression*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1677363>.
215. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. *The IL-12 Family of Heterodimeric Cytokines*. n.d. [https://www.cell.com/immunity/abstract/S1074-7613\(03\)00296-6](https://www.cell.com/immunity/abstract/S1074-7613(03)00296-6) (17 June 2026, date last accessed).
216. Heckel MC, Wolfson A, Slachta CA et al. Human breast tumor cells express IL-10 and IL-12p40 transcripts and proteins, but do not produce IL-12p70. *Cell Immunol* 2011;**266**(2):143–53. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.09.010>.
217. Gilmour BC, Corthay A, Øynebråten I. High production of IL-12 by human dendritic cells stimulated with combinations of pattern-recognition receptor agonists. *Npj Vaccines* 2024;**9**(1):83. <https://doi.org/10.1038/s41541-024-00869-1>.
218. Kang B, Xing Q, Huang Y et al. *Large-Scale Generation of IL-12 Secreting Macrophages from Human Pluripotent Stem Cells for Cancer Therapy*. n.d. [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/advances/abstract/S2329-0501\(24\)00020-2](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/advances/abstract/S2329-0501(24)00020-2) (17 June 2026, date last accessed).
219. Seder RA, Gazzinelli R, Sher A et al. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci* 1993;**90**(21):10188–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.10188>.
220. Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S et al. Interleukin-12: Biological Properties and Clinical Application. *Clin Cancer Res* 2007;**13**(16):4677–85. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0776>.
221. Terabe M, Park JM, Berzofsky JA. Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. *Cancer Immunol Immunother* 2003;**53**(2):79–85. <https://doi.org/10.1007/s00262-003-0445-0>.
222. Joshi BH, Hogaboam C, Dover P et al. Role of Interleukin-13 in Cancer, Pulmonary Fibrosis, and Other TH2-Type Diseases. In: *Interleukins, Vitamins &*

Hormones. n.p.: Academic Press, 2006, 74.479–504.
[https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(06\)74019-5](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(06)74019-5).

223. Jaén M, Martín-Regalado Á, Bartolomé RA *et al.* Interleukin 13 receptor alpha 2 (IL13R α 2): Expression, signaling pathways and therapeutic applications in cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 2022;**1877**(5):188802.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188802>.
224. Cai M, Huang X, Huang X *et al.* *Frontiers | Research Progress of Interleukin-15 in Cancer Immunotherapy*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1184703>.
225. Guo Y, Luan L, Patil NK *et al.* Immunobiology of the IL-15/IL-15R α complex as an antitumor and antiviral agent. *Cytokine Growth Factor Rev* 2017;**38**:10–21.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.08.002>.
226. Fiore PF, Matteo SD, Tumino N *et al.* Interleukin-15 and cancer: some solved and many unsolved questions. *J Immunother Cancer* published online 17 Nov. 2020. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001428>.
227. Gao H, Ma T, Jiang Q *et al.* *Frontiers | Advances in IL-15–Based Cancer Immunotherapy and Divergent Immunological Effects of IL-2 and IL-15 Signaling via the Shared IL-2R β Receptor*. n.d.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2026.1791059>.
228. Ma S, Caligiuri MA, Yu J. *Harnessing IL-15 Signaling to Potentiate NK Cell-Mediated Cancer Immunotherapy*. n.d.
[https://www.cell.com/trends/immunology/abstract/S1471-4906\(22\)00164-8](https://www.cell.com/trends/immunology/abstract/S1471-4906(22)00164-8)
 (17 June 2026, date last accessed).
229. Cochaud S, Giustiniani J, Thomas C *et al.* IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2. *Sci Rep* 2013;**3**(1):3456. <https://doi.org/10.1038/srep03456>.
230. Welte T, Zhang XHF. Interleukin-17 Could Promote Breast Cancer Progression at Several Stages of the Disease. *Mediators Inflamm* 2015;**2015**(1):804347.
<https://doi.org/10.1155/2015/804347>.
231. Mombelli S, Cochaud S, Merrouche Y *et al.* IL-17A and its homologs IL-25/IL-17E recruit the c-RAF/S6 kinase pathway and the generation of pro-oncogenic LMW-E in breast cancer cells. *Sci Rep* 2015;**5**(1):11874.
<https://doi.org/10.1038/srep11874>.
232. Furuta S, Jeng YM, Zhou L *et al.* IL-25 Causes Apoptosis of IL-25R–Expressing Breast Cancer Cells Without Toxicity to Nonmalignant Cells. *Sci Transl Med* 2011;**3**(78):78ra31–78ra31. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001374>.
233. Younesi V, Nejatollahi F. Induction of anti-proliferative and apoptotic effects by anti-IL-25 receptor single chain antibodies in breast cancer cells. *Int Immunopharmacol* 2014;**23**(2):624–32.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.10.015>.
234. Saran A, Nishizaki D, Lippman SM *et al.* Interleukin-17: A pleiotropic cytokine implicated in inflammatory, infectious, and malignant disorders. *Cytokine*

- Growth Factor Rev* 2025;**83**:35–44.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2025.01.002>.
235. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 2010;**129**(3):311–21.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03240.x>.
 236. Mills KHG. IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. *Nat Rev Immunol* 2023;**23**(1):38–54. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00746-9>.
 237. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity* 2019;**50**(4):892–906.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.021>.
 238. Chang SH, Dong C. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res* 2007;**17**(5):435–40.
<https://doi.org/10.1038/cr.2007.35>.
 239. Zhu X, Mulcahy LA, Mohammed RA et al. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res* 2008;**10**(6):R95. <https://doi.org/10.1186/bcr2195>.
 240. Gaffen SL, Jain R, Garg AV et al. The IL-23–IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol* 2014;**14**(9):585–600.
<https://doi.org/10.1038/nri3707>.
 241. Veldhoen M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat Immunol* 2017;**18**(6):612–21. <https://doi.org/10.1038/ni.3742>.
 242. Sepehri-Manesh S, Debeaud M, Vouret-Craviari V. Unlocking IL-18: A hidden key in cancer immunity. *Semin Immunol* 2025;**80**:101997.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2025.101997>.
 243. Xiao Y, Zhao X, Guo Y et al. Expression and function of cytokine interleukin-22 gene in the tumor microenvironment of triple negative breast cancer. *Cytokine* 2024;**179**:156590. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2024.156590>.
 244. Hunzeker ZE, Zhao L, Kim AM et al. The role of IL-22 in cancer. *Med Oncol* 2024;**41**(10):240. <https://doi.org/10.1007/s12032-024-02481-8>.
 245. Maleki AH, Rajabivahid M, Khosh E et al. Harnessing IL-27: challenges and potential in cancer immunotherapy. *Clin Exp Med* 2025;**25**(1):34.
<https://doi.org/10.1007/s10238-025-01562-w>.
 246. Fabbi M, Carbotti G, Ferrini S. Dual Roles of IL-27 in Cancer Biology and Immunotherapy. *Mediators Inflamm* 2017;**2017**(1):3958069.
<https://doi.org/10.1155/2017/3958069>.
 247. Xu J, Long Q, Zhou M et al. Targeting IL27RA Enhances Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer by Modulating Tumor Cells and the Tumor Microenvironment. *Adv Sci* 2026;**13**(14):e16703.
<https://doi.org/10.1002/adv.202516703>.

248. Liu H, Yang Z, Lu W *et al.* Chemokines and chemokine receptors: A new strategy for breast cancer therapy. *Cancer Med* 2020;**9**(11):3786–99. <https://doi.org/10.1002/cam4.3014>.
249. Jin WJ, Kim B, Kim D *et al.* NF- κ B signaling regulates cell-autonomous regulation of CXCL10 in breast cancer 4T1 cells. *Exp Mol Med* 2017;**49**(2):e295–e295. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.148>.
250. Jafarzadeh A, Fooladseresht H, Nemati M *et al.* Higher circulating levels of chemokine CXCL10 in patients with breast cancer: Evaluation of the influences of tumor stage and chemokine gene polymorphism. *Cancer Biomark* 2016;**16**(4):545–54. <https://doi.org/10.3233/CBM-160596>.
251. Mulligan AM, Raitman I, Feeley L *et al.* Tumoral Lymphocytic Infiltration and Expression of the Chemokine CXCL10 in Breast Cancers from the Ontario Familial Breast Cancer Registry. *Clin Cancer Res* 2013;**19**(2):336–46. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3314>.
252. Fang WB, Jokar I, Zou A *et al.* CCL2/CCR2 Chemokine Signaling Coordinates Survival and Motility of Breast Cancer Cells through Smad3 Protein- and P42/44 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)-Dependent Mechanisms *. n.d. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)62633-3/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)62633-3/abstract) (17 June 2026, date last accessed).
253. Lubowicka E, Przylipek A, Zajkowska M *et al.* Plasma Chemokine CCL2 and Its Receptor CCR2 Concentrations as Diagnostic Biomarkers for Breast Cancer Patients. *BioMed Res Int* 2018;**2018**(1):2124390. <https://doi.org/10.1155/2018/2124390>.
254. Yoshimura T, Li C, Wang Y *et al.* The chemokine monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 is a promoter of breast cancer metastasis. *Cell Mol Immunol* 2023;**20**(7):714–38. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01013-0>.
255. Kanyomse Q, Le X, Tang J *et al.* KLF15 suppresses tumor growth and metastasis in Triple-Negative Breast Cancer by downregulating CCL2 and CCL7. *Sci Rep* 2022;**12**(1):19026. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23750-4>.
256. Ben-Baruch A, Xu L, Young PR *et al.* Monocyte Chemotactic Protein-3 (MCP3) Interacts with Multiple Leukocyte Receptors: C-C CKR1, A RECEPTOR FOR MACROPHAGE INFLAMMATORY PROTEIN-1 α /RANTES, IS ALSO A FUNCTIONAL RECEPTOR FOR MCP3 (*). *J Biol Chem* 1995;**270**(38):22123–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.38.22123>.
257. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG *et al.* Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy. *J Exp Med* 2001;**193**(6):727–40. <https://doi.org/10.1084/jem.193.6.727>.
258. Aharinejad S, Paulus P, Sioud M *et al.* Colony-Stimulating Factor-1 Blockade by Antisense Oligonucleotides and Small Interfering RNAs Suppresses Growth of Human Mammary Tumor Xenografts in Mice. *Cancer Res* 2004;**64**(15):5378–84. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0961>.

259. Ding J, Guo C, Hu P *et al.* *Spandidos Publications: International Journal of Oncology*. n.d. <https://www.spandidos-publications.com/ijo> (17 June 2026, date last accessed).
260. Shettigar A, Salunke R, Modi D *et al.* Targeting molecular cross-talk between tumor cells and tumor associated macrophage as therapeutic strategy in triple negative breast cancer. *Int Immunopharmacol* 2023;**119**:110250. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110250>.
261. Fang WB, Yao M, Brummer G *et al.* Targeted gene silencing of CCL2 inhibits triple negative breast cancer progression by blocking cancer stem cell renewal and M2 macrophage recruitment. *Oncotarget* published online 7 June 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9885>.
262. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N *et al.* Regulatory T Cells Recruited through CCL22/CCR4 Are Selectively Activated in Lymphoid Infiltrates Surrounding Primary Breast Tumors and Lead to an Adverse Clinical Outcome. *Cancer Res* 2009;**69**(5):2000–9. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2360>.
263. Li YQ, Liu FF, Zhang XM *et al.* *Tumor Secretion of CCL22 Activates Intratumoral Treg Infiltration and Is Independent Prognostic Predictor of Breast Cancer*. n.d. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076379>.
264. Faget J, Biota C, Bachelot T *et al.* Early Detection of Tumor Cells by Innate Immune Cells Leads to Treg Recruitment through CCL22 Production by Tumor Cells. *Cancer Res* 2011;**71**(19):6143–52. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0573>.
265. Sabit H, Adel A, Abdelfattah MM *et al.* The role of tumor microenvironment and immune cell crosstalk in triple-negative breast cancer (TNBC): Emerging therapeutic opportunities. *Cancer Lett* 2025;**628**:217865. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2025.217865>.
266. Wu L, Sun S, Qu F *et al.* CXCL9 influences the tumor immune microenvironment by stimulating JAK/STAT pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2022;**72**(6):1479–92. <https://doi.org/10.1007/s00262-022-03343-w>.
267. Gandhi S, Deshmukh SK, Canning MT *et al.* Real-world evaluation of CXCL9/10 with PD-L1 and TMB as predictors of pembrolizumab benefit in triple-negative breast cancer (TNBC). *J Clin Oncol* 2026;**44**(16_suppl):1125–1125. https://doi.org/10.1200/JCO.2026.44.16_suppl.1125.
268. Bhavsar I, Miller CS, Al-Sabbagh M. *Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha (MIP-1 Alpha)/CCL3: As a Biomarker*. 2015. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7696-8_27.
269. Nath A, Chattopadhyaya S, Chattopadhyay U *et al.* Macrophage inflammatory protein (MIP)1 α and MIP1 β differentially regulate release of inflammatory cytokines and generation of tumoricidal monocytes in malignancy. *Cancer Immunol Immunother* 2006;**55**(12):1534–41. <https://doi.org/10.1007/s00262-006-0149-3>.

270. Ayoub AM, EL-Houseini ME, Tharwat E *et al.* The potential directing role of chemokines for specific metastatic sites in breast cancer. *Sci Rep* 2026;**16**(1):12015. <https://doi.org/10.1038/s41598-026-45036-9>.
271. Ayoub NM, Sardiah S, Al-Share QY *et al.* *Exploring Angiogenic Pathways in Breast Cancer: Clinicopathologic Correlations and Prognostic Implications Based on Gene Expression Profiles from a Large-Scale Genomic Dataset.* n.d. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0310557>.
272. Anan K, Morisaki T, Katano M *et al.* *Vascular Endothelial Growth Factor and Platelet-Derived Growth Factor Are Potential Angiogenic and Metastatic Factors in Human Breast Cancer.* n.d. [https://www.surgjournal.com/article/S0039-6060\(96\)80120-6/abstract](https://www.surgjournal.com/article/S0039-6060(96)80120-6/abstract) (17 June 2026, date last accessed).
273. Ariad S, Seymour L, Bezwoda WR. Platelet-derived growth factor (PDGF) in plasma of breast cancer patients: Correlation with stage and rate of progression. *Breast Cancer Res Treat* 1991;**20**(1):11–7. <https://doi.org/10.1007/BF01833352>.
274. Badodekar N, Sharma A, Patil V *et al.* Angiogenesis induction in breast cancer: A paracrine paradigm. *Cell Biochem Funct* 2021;**39**(7):860–73. <https://doi.org/10.1002/cbf.3663>.
275. Giricz O, Calvo V, Peterson EA *et al.* TACE-dependent TGF α shedding drives triple-negative breast cancer cell invasion. *Int J Cancer* 2013;**133**(11):2587–95. <https://doi.org/10.1002/ijc.28295>.
276. Mercogliano MF, Bruni S, Elizalde PV *et al.* *Frontiers | Tumor Necrosis Factor α Blockade: An Opportunity to Tackle Breast Cancer.* n.d. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00584>.
277. Shinde A, Chandak N, Singh J *et al.* TNF- α induced NF- κ B mediated LYRM7 expression modulates the tumor growth and metastatic ability in breast cancer. *Free Radic Biol Med* 2024;**211**:158–70. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.12.018>.
278. Rivas MA, Carnevale RP, Proietti CJ *et al.* TNF α acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF- κ B-dependent pathways. *Exp Cell Res* 2008;**314**(3):509–29. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.10.005>.
279. Wolf MJ, Seleznik GM, Zeller N *et al.* The unexpected role of lymphotoxin β receptor signaling in carcinogenesis: from lymphoid tissue formation to liver and prostate cancer development. *Oncogene* 2010;**29**(36):5006–18. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.260>.
280. Nishiki E, Hirakata T, Endo M *et al.* *Relationship between VEGF-A and PD-L1 Expression in Primary Breast Cancer.* n.d. [https://www.ejccancer.com/article/S0959-8049\(20\)30730-9/abstract](https://www.ejccancer.com/article/S0959-8049(20)30730-9/abstract) (17 June 2026, date last accessed).

281. Bahhnassy A, Mohanad M, Shaarawy S et al. *Spandidos Publications: Molecular Medicine Reports*. n.d. <https://www.spandidos-publications.com/mmr> (17 June 2026, date last accessed).
282. Ribatti D, Nico B, Ruggieri S et al. Angiogenesis and Antiangiogenesis in Triple-Negative Breast cancer. *Transl Oncol* 2016;**9**(5):453–7. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2016.07.002>.
283. Han MI, Atalay P, Satir-Basaran G. The VEGF/VEGFR axis in triple-negative breast cancer: a comprehensive review of therapeutic strategies. *Gene* 2026;**1001**:150201. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2026.150201>.
284. Wang L, Zhang L, Zhao L et al. *VEGFA/NRP-1/GAPVD1 Axis Promotes Progression and Cancer Stemness of Triple-Negative Breast Cancer by Enhancing Tumor Cell-Macrophage Crosstalk*. n.d. <https://www.ijbs.com/v20p0446.htm> (17 June 2026, date last accessed).
285. Interaction between VEGF-A and immune checkpoint targets in triple-negative breast cancer and mechanisms of immune evasion and tumor progression. *J Clin Oncol* n.d. https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2024.42.16_suppl.1096 (17 June 2026, date last accessed).
286. Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U et al. *Significantly Higher Levels of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Shorter Survival Times for Patients with Primary Operable Triple-Negative Breast Cancer*. n.d. [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)40853-3/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)40853-3/fulltext) (17 June 2026, date last accessed).
287. Sayed N, Huang Y, Nguyen K et al. An inflammatory aging clock (iAge) based on deep learning tracks multimorbidity, immunosenescence, frailty and cardiovascular aging. *Nat Aging* 2021;**1**(7):598–615. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00082-y>.
288. Zhang T, Huang Y, Ji X et al. CCL11 (Eotaxin) Promotes the Advancement of Aging-Related Cardiovascular Diseases. *Rev Cardiovasc Med* 2025;**26**(2). <https://doi.org/10.31083/RCM26020>.
289. Hoefer J, Luger M, Dal-Pont C et al. *Frontiers | The “Aging Factor” Eotaxin-1 (CCL11) Is Detectable in Transfusion Blood Products and Increases with the Donor’s Age*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00402>.
290. Thomas A, Guo J, Reyes-Dumeyer D et al. Inflammatory biomarkers profiles and cognition among older adults. *Sci Rep* 2025;**15**(1):2265. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-86309-z>.
291. Guo J, Schupf N, Mayeux RP et al. Reproducibility of serum cytokines in an elderly population. *Immun Ageing* 2020;**17**(1):29. <https://doi.org/10.1186/s12979-020-00201-0>.
292. Seo DH, Corr M, Patel S et al. Chemokine CXCL9, a marker of inflammaging, is associated with changes of muscle strength and mortality in older men. *Osteoporos Int* 2024;**35**(10):1789–96. <https://doi.org/10.1007/s00198-024-07160-y>.

293. Eder K, Baffy N, Falus A *et al.* The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflamm Res* 2009;**58**(11):727–36. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0060-4>.
294. El-Mikkawy DME, EL-Sadek MA, EL-Badawy MA *et al.* Circulating level of interleukin-6 in relation to body mass indices and lipid profile in Egyptian adults with overweight and obesity. *Egypt Rheumatol Rehabil* 2020;**47**(1):7. <https://doi.org/10.1186/s43166-020-00003-8>.
295. Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Rodríguez A *et al.* Involvement of serum vascular endothelial growth factor family members in the development of obesity in mice and humans. *J Nutr Biochem* 2010;**21**(8):774–80. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.05.004>.
296. Lijnen HR. Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc Res* 2008;**78**(2):286–93. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm007>.
297. Herold J, Kalucka J. *Frontiers | Angiogenesis in Adipose Tissue: The Interplay Between Adipose and Endothelial Cells*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.624903>.
298. Wei J, Mayberry CL, Lv X *et al.* IL3-Driven T Cell–Basophil Crosstalk Enhances Antitumor Immunity. *Cancer Immunol Res* 2024;**12**(7):822–39. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-23-0851>.
299. Lian Q, Nie J, Singh J *et al.* CD4+ T cells impair tumor growth through IL-3 and TNF-dependent vascular damage. *Science* 2026;**392**(6804):eads7910. <https://doi.org/10.1126/science.ads7910>.
300. Thompson EJ, Escarbe S, Tvorogov D *et al.* Interleukin-3 production by basal-like breast cancer cells is associated with poor prognosis. *Growth Factors* 2024;**42**(2):49–61. <https://doi.org/10.1080/08977194.2023.2297693>.
301. Lopatina T, Koni M, Grange C *et al.* IL-3 signalling in the tumour microenvironment shapes the immune response *via* tumour endothelial cell-derived extracellular vesicles. *Pharmacol Res* 2022;**179**:106206. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106206>.
302. Koni M, Castellano I, Venturelli E *et al.* Interleukin-3-Receptor-α in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC): An Additional Novel Biomarker of TNBC Aggressiveness and a Therapeutic Target. *Cancers* 2022;**14**(16):3918. <https://doi.org/10.3390/cancers14163918>.
303. Barry KC, Hsu J, Broz ML *et al.* A natural killer–dendritic cell axis defines checkpoint therapy–responsive tumor microenvironments. *Nat Med* 2018;**24**(8):1178–91. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0085-8>.
304. Brasel K, De Smedt T, Smith JL *et al.* Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand–supplemented bone marrow cultures. *Blood* 2000;**96**(9):3029–39. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.9.3029>.
305. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE *et al.* Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and

- natural killer cells. *Blood* 2000;**95**(11):3489–97.
<https://doi.org/10.1182/blood.V95.11.3489>.
306. Peterlin P, Gaschet J, Guillaume T et al. FLT3 ligand plasma levels in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2019;**104**(6):e240–3.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2018.209460>.
 307. Chen H, Wu M, Xia H et al. *Frontiers | FLT3LG and IFITM3P6 Consolidate T Cell Activity in the Bone Marrow Microenvironment and Are Prognostic Factors in Acute Myelocytic Leukemia*. n.d. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.980911>.
 308. Lu Y, Li X, Chao T et al. FLT3LG as an inflammatory hub bridging tumor immune surveillance to therapy response in breast cancer. *Clin Exp Med* 2025;**25**(1):333. <https://doi.org/10.1007/s10238-025-01889-4>.
 309. Zhao J, Liu H, Zhang X et al. Tumor Cells Interleukin-22 Expression Associates with Elevated Tumor-Associated Macrophages Infiltrating and Poor Prognosis in Patients with Breast Cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2021;**36**(2):160–6.
<https://doi.org/10.1089/cbr.2020.3794>.
 310. Wang S, Yao Y, Yao M et al. Interleukin-22 promotes triple negative breast cancer cells migration and paclitaxel resistance through JAK-STAT3/MAPKs/AKT signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;**503**(3):1605–9.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.088>.
 311. Jiang R, Sun B. *IL-22 Signaling in the Tumor Microenvironment*. 2021.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-55617-4_5.
 312. Katara GK, Kulshrestha A, Schneiderman S et al. Interleukin-22 promotes development of malignant lesions in a mouse model of spontaneous breast cancer. *Mol Oncol* 2020;**14**(1):211–24. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12598>.
 313. Briukhovetska D, Suarez-Gosalvez J, Voigt C et al. T cell-derived interleukin-22 drives the expression of CD155 by cancer cells to suppress NK cell function and promote metastasis. *Immunity* 2023;**56**(1):143-161.e11.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.12.010>.
 314. Bambal V, Kodihalli Basavaraj P, Vanaja K. Chemokine receptor type-5: a key regulator of immunity, disease pathogenesis, and emerging therapeutic target. *Inflammopharmacology* 2025;**33**(8):4477–98. <https://doi.org/10.1007/s10787-025-01871-2>.
 315. Pervaiz A, Zepp M, Mahmood S et al. CCR5 blockage by maraviroc: a potential therapeutic option for metastatic breast cancer. *Cell Oncol* 2018;**42**(1):93–106.
<https://doi.org/10.1007/s13402-018-0415-3>.
 316. Rosado-Sanz M, Martínez-Alarcón N, Meel MH et al. Tumor-educated macrophages promote cytokine-driven lung colonization in triple-negative breast cancer. *Oncol Immunology* 2026;**15**(1):2687381.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2026.2687381>.
 317. Tzenios N, Tazanios ME, Chahine M. *The Impact of BMI on Breast Cancer – an Updated Systematic... : Medicine*. n.d. <https://journals.lww.com/md->

journal/fulltext/2024/02020/the_impact_of_bmi_on_breast_cancer___an_updated.40.aspx (26 June 2026, date last accessed).

318. Chen PH, Gowda K, Leonard M *et al.* Associations between body mass index with cancer recurrence and all-cause mortality among survivors of breast cancer. *J Clin Oncol* 2023;**41**(16_suppl):12074–12074. https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.12074.
319. Argueta V, Carolina F. *Body Mass Index and Risks of Recurrence and Mortality by Breast Cancer Subtype*. n.d. <https://digital.lib.washington.edu/researchworks/items/390e2ea0-a01a-4872-8023-dd46774e3ec9> (26 June 2026, date last accessed).
320. Chen H, Qian X, Tao Y *et al.* Impact of body mass index and its change on survival outcomes in patients with early breast cancer: A pooled analysis of individual-level data from BCIRG-001 and BCIRG-005 trials. *The Breast* 2023;**71**:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2023.07.002>.
321. Kawai M, Malone KE, Tang MTC *et al.* Height, body mass index (BMI), BMI change, and the risk of estrogen receptor-positive, HER2-positive, and triple-negative breast cancer among women ages 20 to 44 years. *Cancer* 2014;**120**(10):1548–56. <https://doi.org/10.1002/cncr.28601>.
322. Fang S, Wang Y, Chun YS *et al.* The relationship between blood IL-12p40 level and melanoma progression. *Int J Cancer* 2015;**136**(8):1874–80. <https://doi.org/10.1002/ijc.29182>.
323. Stanilov N, Miteva L, Jovchev J *et al.* The prognostic value of preoperative serum levels of IL-12p40 and IL-23 for survival of patients with colorectal cancer. *APMIS* 2014;**122**(12):1223–9. <https://doi.org/10.1111/apm.12288>.
324. Fountzilias E, Pearce T, Baysal MA *et al.* Convergence of evolving artificial intelligence and machine learning techniques in precision oncology. *Npj Digit Med* 2025;**8**(1):75. <https://doi.org/10.1038/s41746-025-01471-y>.
325. Zhang B, Shi H, Wang H. *Machine Learning and AI in Cancer Prognosis | JMDH | Dove Medical Press*. n.d. <https://www.dovepress.com/machine-learning-and-ai-in-cancer-prognosis-prediction-and-treatment-s-peer-reviewed-fulltext-article-JMDH> (28 June 2026, date last accessed).
326. Bhushan R, Rai S, Jangra P *et al.* The role of artificial intelligence in predicting cancer immunotherapy response. *Oral Oncol Rep* 2025;**16**:100767. <https://doi.org/10.1016/j.oor.2025.100767>.
327. Ren Z, Ren Y, Liu P *et al.* *Identification of Unique Cytokine Expressions in Tumor Immune Microenvironment for Various Cancer Types Using Single-Cell RNA Sequencing Data via Machine Learning*, New Results. published online 1 June 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.06.01.542694>.
328. Wang Y, Lin A, Liu Z *et al.* Tumor Microenvironment Onmyoji: Cytokines with Dual Protumor and Antitumor Roles. *Cancer Commun* 2026;**46**:0008. <https://doi.org/10.34133/cancomm.0008>.

Ringraziamenti

La realizzazione di questo elaborato è stata possibile con il patrocinio dell'associazione AIRC e del progetto AIRC Campus, a cui vanno i più sentiti ringraziamenti.

Si ringrazia per l'opportunità conferitami di lavorare al progetto A-BRAVE la prof.ssa Maria Vittoria Dieci.

Si ringrazia per l'infinità disponibilità e tempo dedicato alla revisione dell'elaborato il dott. Davide Massa.

Si ringrazia per l'esecuzione del dosaggio delle citochine plasmatiche la dott.ssa Anna Tosi.

Si ringrazia per l'elaborazione dei dati e l'analisi statistica il prof. Silvio Bicciato.

Si ringrazia per tutto il tempo, la pazienza e il sudore investito nell'organizzazione del database dello studio A-BRAVE la dott.ssa Erica Dal Pozzo.