

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina DIMED

Dipartimento di Neuroscienze, sezione di Otorinolaringoiatria

TESI DI LAUREA

**RUOLO PROGNOSTICO DEL TUMOR-STROMA
RATIO E DI PD-L1 (PROGRAMMED DEATH
LIGAND 1) NEL CARCINOMA LARINGEO. UNO
STUDIO CLINICO-PATOLOGICO**

Relatore

Prof. Gino Marioni

Correlatore

Dott.ssa Lara Alessandrini

Laureando

Alessandro Drigo

Matricola

1142524

Anno Accademico 2021-2022

SOMMARIO

1	RIASSUNTO	1
2	INTRODUZIONE	3
2.1	La malattia neoplastica della laringe.....	3
2.1.1	Anatomia della laringe	3
2.1.2	Il carcinoma a cellule squamose della laringe: epidemiologia e fattori di rischio.....	5
2.1.3	Sedi di presentazione e sintomatologia	6
2.1.4	Diagnosi.....	6
2.1.5	Stadiazione	8
2.1.6	Terapia.....	10
2.1.7	Trattamento chirurgico	10
2.1.8	Trattamenti non chirurgici	12
2.1.9	Trattamento metastasi linfonodali cervicali	13
2.1.10	Farmaci biologici.....	13
2.1.11	Follow-up.....	15
2.2	Microambiente tumorale	16
2.2.1	Transizione epitelio-mesenchimale e CAFs.....	16
2.2.2	TSR.....	19
2.2.3	Utilizzo del TSR come marcatore prognostico nelle neoplasie solide.....	20
2.3	Ruolo del sistema immunitario	21
2.3.1	Interazione tra sistema immunitario e tumore.....	21
2.3.2	I recettori inibitori: CTLA-4 e PD-L1.....	22
2.3.3	Immunoterapia basata sulla via PD-1/PD-L1.....	25
2.4	L'importanza di ricercare nuovi marcatori nel LSCC	28
3	SCOPO DELLO STUDIO.....	29
4	MATERIALI E METODI.....	31
4.1	Pazienti.....	31
4.2	Indagini istopatologiche	32
4.3	Immunoistochimica.....	34
4.4	Analisi statistica.....	35
5	RISULTATI	36
5.1	Outcome generale.....	36
5.2	Concordanza tra biopsie e relativi campioni operatori in relazione al parametro TSR ed alle altre variabili patologiche	37

5.3	Associazione tra TSR e altre variabili clinico-patologiche sia sulle biopsie che nei rispettivi campioni chirurgici.....	43
5.4	Valore prognostico del TSR e delle variabili clinico-patologiche	44
6	DISCUSSIONE.....	48
6.1	Significato della TSR come marker di aggressività biologica negli LSCC	48
6.2	PD-L1 e TSR	50
7	CONCLUSIONI.....	52
8	BIBLIOGRAFIA.....	53

1 RIASSUNTO

Background: l'espressione del *Programmed cell death ligand 1* (PD-L1) sembra basarsi su strette relazioni tra cellule neoplastiche e immunitarie nel microambiente tumorale. Il *tumor-stroma ratio* (TSR) è stato associato alla prognosi in diverse neoplasie maligne.

Scopo dello studio: gli obiettivi di questa indagine esplorativa sono stati di analizzare per la prima volta: (i) l'associazione tra TSR, l'espressione di PD-L1 e altre caratteristiche clinico-patologiche in biopsie di carcinoma a cellule squamose della laringe (LSCC) e rispettivi campioni chirurgici; (ii) ruolo prognostico e predittivo di TSR e PD-L1.

Materiali e metodi: il TSR, l'espressione di PD-L1 (in termini di *combined positive score* -CPS-) e altre caratteristiche clinico-patologiche sono state analizzate in biopsie e campioni chirurgici di 43 casi di LSCC.

Risultati: è stato riscontrato un buon accordo tra biopsie e campioni chirurgici per il parametro TSR (statistica AC1 0.7957). Un CPS<1 valutato sui campioni chirurgici è stato associato a un basso TSR (*stroma rich*) sia sulle biopsie che sui campioni chirurgici (p=0.0143 e p=0.0063). Un basso TSR ha mostrato un valore prognostico negativo significativo quando valutato sia su biopsie che su campioni chirurgici (HR=8.808, p=0.0003 e HR=11.207, p=0.0002). Il CPS≥1 sembrava essere un fattore prognostico favorevole (HR=0.100, p=0.0265).

Conclusioni: l'associazione tra i campioni biopsici e chirurgici per quanto riguarda il TSR e l'espressione di PD-L1 dovrebbe essere ulteriormente studiata per un potenziale impatto sui trattamenti mirati, anche per sviluppare protocolli immunoterapeutici.

Background: Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) seems to rely on close relations between neoplastic and immune cells in the tumor

microenvironment. Tumor to stroma ratio (TSR) has been associated with prognosis in different malignancies.

The aims of this exploratory investigation were to analyze for the first time the: (i) association between TSR, PD-L1 expression and other clinical-pathological features in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) biopsies and paired surgical specimens; (ii) prognostic and predictive role of TSR and PD-L1.

Materials and methods: TSR, PD-L1 expression (in terms of combined positive score [CPS]), and other clinical-pathological features were analyzed in biopsies and surgical specimens of 43 consecutive LSCC cases.

Results: good agreement between biopsies and surgical specimens was found for TSR (AC1 statistic 0.7957). A $CPS < 1$ evaluated on surgical specimens was associated with a low TSR (stroma rich) on both biopsies and surgical specimens ($p=0.0143$ and $p=0.0063$). Low TSR showed a significant negative prognostic value when evaluated on both biopsies and surgical specimens ($HR=8.808$, $p=0.0003$ and $HR=11.207$, $p=0.0002$). $CPS \geq 1$ appeared to be a favorable prognostic factor ($HR=0.100$, $p=0.0265$).

Conclusion: the association between biopsies and surgical specimens TSR and PD-L1 expression should be further investigated for a potential impact on targeted treatments, also with regard to immunotherapeutic protocols.

2 INTRODUZIONE

2.1 La malattia neoplastica della laringe

2.1.1 Anatomia della laringe

La laringe può essere suddivisa in 3 porzioni, importanti da ricordare perché una diversa localizzazione del tumore dà luogo a un corredo sintomatologico differente. Nello specifico, si possono identificare:

- La laringe sovraglottica, la quale si trova al di sopra di un piano immaginario passante per il margine superiore delle corde vocali (in continuità con la faringe). In tale sede sono collocate: l'epiglottide, le pliche ari-epiglottiche, le aritenoidi, le false corde, il fondo e il tetto del ventricolo(1).

A livello istologico è rivestita da epitelio di tipo respiratorio con alcune aree di metaplasia pavimentosa da stimoli meccanici (soprattutto in epiglottide, pliche ariepiglottiche e aritenoidi). Al di sotto della mucosa si trova la lamina quadrangolare (tessuto elastico) tesa tra il margine laterale dell'epiglottide e le aritenoidi; essa termina a livello delle false corde, formando il legamento vestibolare(2).

- La laringe glottica, che comprende il piano delle corde vocali (dal piano immaginario passante per il margine superiore delle corde vocali fino a 1cm inferiormente a questo piano). In essa si trovano: le corde vocali vere, la commisura anteriore (cioè il punto di unione delle corde vocali anteriormente sulla cartilagine della tiroide) e posteriore e infine il pavimento del ventricolo(1).

Si compone di un epitelio pavimentoso pseudostratificato, al di sotto di cui si trova il cono elastico, il quale origina dalle corde vocali ed è in continuità con il cono elastico della trachea(2).

- La laringe ipoglottica o sottoglottica, che va dal limite inferiore della laringe glottica fino all'inizio della trachea, ossia fino al margine inferiore della cartilagine cricoide(1).

È rivestita da epitelio di tipo respiratorio(2).

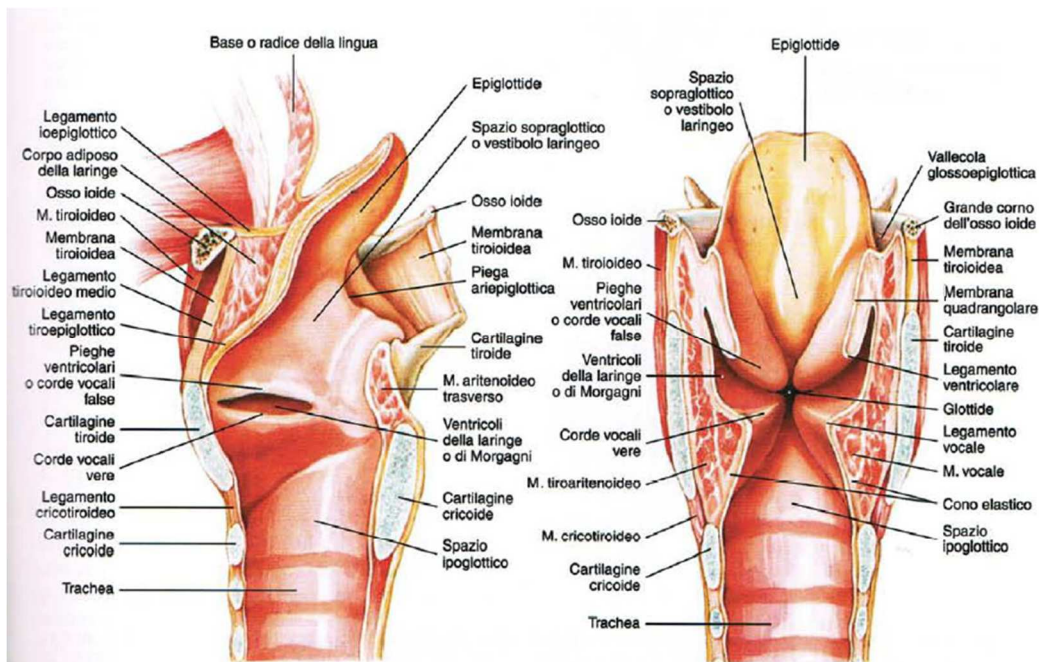


Figura 1: configurazione interna della laringe in sezione sagittale e in sezione frontale(3)

Le funzioni a cui assolve la laringe sono:

- Fonazione, sfruttando i movimenti di adduzione, abduzione, e vibrazione delle corde vocali. Queste ultime determinano inoltre delle importanti differenze nella produzione fonatoria: nello specifico, una variazione della loro lunghezza, tensione, spessore è associata a variazione della frequenza della voce.
- Respirazione, dato che permette il passaggio di aria dalla faringe alla trachea.
- Protezione delle vie aeree da eventuali corpi estranei: avviene a livello sovraglottico con un meccanismo di chiusura della epiglottide, e a livello glottico mediante adduzione delle corde vocali.
- Funzione secondarie: l'adduzione delle corde vocali permette di compiere la manovra di Valsalva, fondamentale per azioni come il sollevamento di oggetti pesanti, la minzione, il ponzamento e l'espulsione del feto durante il parto(2).

2.1.2 Il carcinoma a cellule squamose della laringe: epidemiologia e fattori di rischio

Il carcinoma della laringe costituisce il tumore più frequente del tratto aerodigestivo superiore (28%), rappresentando circa il 2.5% di tutti i tumori maligni nell'uomo e lo 0.5% nella donna. In Italia la sua incidenza è stimata in 3 casi/100.000/anno(4). Il picco di incidenza si ha tra la VI e la VII decade di vita. Si tratta di un tumore prevalentemente legato al sesso maschile, con un rapporto di circa 10:1 (in Italia, in altri paesi il rapporto è diverso)(5) ma, come per l'adenocarcinoma polmonare, le differenze si stanno via a via appianando per una diffusione del tabagismo presso il sesso femminile (lo stesso fattore culturale che giustifica un rapporto diverso di prevalenza tra i due sessi nei diversi paesi)(6). Infatti proprio il fumo di tabacco, assieme all'alcool, rappresenta uno dei principali fattori di rischio per questo tipo di neoplasia, accompagnato dall'infezione cronica con HPV, dal reflusso gastro-esofageo cronico, dall'esposizione occupazionale a fumi e da una storia di irradiazione del distretto testa-collo(7,8)

Per quanto riguarda la caratterizzazione istopatologica, esiste un'enorme varietà di neoplasie della laringe. I tumori di origine epiteliali sono quelli più diffusi: l'istotipo squamoso da solo è responsabile del 90/95% delle neoplasie totali(9,10); seguono poi il carcinoma a cellule fusate, l'adenocarcinoma, il carcinoma mucoepidermoide, il carcinoma linfoepiteliale e molti altri tumori originanti dai tessuti epiteliali. Per quanto riguarda i tessuti molli, da essi possono svilupparsi il fibrosarcoma, l'istocitoma fibroso maligno e altri tumori di origine mesenchimale come il liposarcoma, il rhabdomiosarcoma e il leiomiomasarcoma; altre volte la laringe è sede di infiltrazione di linfomi maligni o sede di metastasi(11). Per quanto concerne il LSCC, si possono ulteriormente suddividere le neoplasie in base al grado di differenziazione citonucleare: con G1 si comprendono i carcinomi ben differenziati, con G2 quelli moderatamente differenziati e infine con G3 quelli scarsamente differenziati(7,8).

2.1.3 Sedi di presentazione e sintomatologia

Il carcinoma si può sviluppare, seguendo l'anatomia dell'organo, a livello glottico (sul piano delle corde vocali), oppure presentarsi a livello della laringe sovra o sottoglottica. La diversa sede di presentazione si concretizza poi con una differente sintomatologia(8):in presenza di una lesione a livello sovraglottico si ha disfagia (fino alla polmonite *ab-ingestis*), odinofagia, otalgia (espressione di un dolore riflesso attraverso le strutture nervose della faringe) ed emoftoe, nel caso in cui la lesione abbia degli aspetti di tipo ulcerativo o erosivo(12). Solitamente la diagnosi di una lesione sovraglottica è tardiva, dato che la lesione deve avere una localizzazione particolare o un elevato volume per dare una manifestazione sintomatologica che induca il paziente a richiedere una consulenza.

In presenza di una lesione a livello glottico si presentano in genere disfonia, tosse secca e nei casi più estremi afonia. In caso di comparsa in tale sede la prognosi è tendenzialmente migliore, poiché il paziente si accorge subito della disfonia e dà inizio all'iter diagnostico(13).

In presenza di una lesione sottoglottica il sintomo dominante è la dispnea. Tali lesioni sono molto poco frequenti; il più delle volte queste sono lesioni glottiche-sottoglottiche, o addirittura transglottiche, cioè interessano tutti e 3 i livelli(14). Dunque spesso in suddetti casi alla dispnea si può associare anche una disfonia, per il co-interessamento glottico(13,15).

2.1.4 Diagnosi

Come per ogni patologia la diagnosi pone le sue basi sull'anamnesi, che in questo caso si deve focalizzare sulla ricerca di fattori di rischio (in primis una storia di abuso di alcool e tabacco) e sulla ricerca dei sintomi tipici di questa neoplasia, come ad esempio la comparsa di disfonia insorta da alcune settimane, o la disfagia in caso di lesione più alta(15).

Una volta posto il quesito diagnostico tramite l'anamnesi si procede attraverso l'esame obiettivo, che consiste nell'esplorazione diretta della laringe tramite una luce frontale ed uno specchietto che aiuta ad esplorare ogni orifizio dell'organo; tale esame può avvenire sia in situazione statica che in situazione dinamica, chiedendo al paziente di fonare dicendo "i" o "e" in modo da visualizzare

la modificazione del piano delle corde vocali e del lume glottico. Parte dell'esame obiettivo consiste anche nella palpazione del collo alla ricerca di linfonodi di dimensioni e/o consistenza alterati(16).

All'esame obiettivo viene affiancata l'indagine endoscopica, con strumento rigido o flessibile, la quale permette di visualizzare al meglio l'esatta anatomia dell'organo e offre la possibilità di eseguire direttamente una biopsia. Se, per caratteristiche della lesione o per eventuali comorbidità presenti si nutre il sospetto di complicanze, la biopsia non può essere eseguita durante una classica seduta di endoscopia, ma deve esser pianificato un intervento chirurgico, in modo da eseguire la procedura a paziente intubato(17).

Per lo studio delle strutture profonde bisogna ricorrere alla diagnostica strumentale: in particolare ci si affida alla TC e alla risonanza magnetica nucleare (RMN) con MDC. Tramite l'utilizzo di queste tecniche si riesce a determinare molto più precisamente l'estensione in profondità del tumore, dato fondamentale per poter intraprendere un corretto iter terapeutico, nonché si può indagare un'eventuale linfonodale (uno dei parametri fondamentali nella stadiazione TNM). Per la ricerca di metastasi linfatiche in realtà ci si può servire anche di indagini prive di radiazioni ionizzanti (la quali portano con sé pur sempre un minimo rischio) come l'ecografia, che può aiutare nella ricerca di linfonodi reattivi(7,8); la sensibilità e la specificità di questo esame (già superiore rispetto alla sola palpazione) possono essere ulteriormente aumentate tramite l'esecuzione di un agoaspirato sempre sotto guida ecografica, andando così alla ricerca diretta di cellule neoplastiche(18).

Infine, per la valutazione delle metastasi a distanza ci si serve solitamente di metodiche total body come la TAC(19); la PET-TC è raccomandata in come imaging di controllo post trattamento radioterapico ma non c'è ancora consensus nel suo utilizzo nel processo diagnostico(20). Nei casi in cui non si abbiano a disposizione questo tipo di strumenti si deve andare ad indagare con esami specifici tutte quelle che sono le sedi di metastatizzazione a distanza più frequenti dei tumori maligni della testa e del collo. In particolare, è necessario eseguire una radiografia del torace per indagare eventuali localizzazioni polmonari, un'ecografia addominale per gli eventuali noduli epatici e infine un dosaggio della fosfatasi alcalina per indagare eventuali metastasi ossee(7).

2.1.5 Stadiazione

Come per ogni neoplasia è stata concordata una classificazione TNM univoca ed universale, strumento necessario di cui si servono gli specialisti per poter dialogare in modo sicuro con le altre figure appartenenti al team multidisciplinare che si occupa della gestione di tale patologia. In particolare, per quanto riguarda il parametro T la classificazione cambia a seconda della porzione di laringe coinvolta. Secondo l'ottava edizione della classificazione TNM (Amin et al.)(21), il tumore sovraglottico è definito

- T1 se limitato ad una sottosedo della sovraglottide con motilità laringea nella norma;
- T2 quando la neoplasia invade più di una sottosedo sovraglottica o la glottide o regioni extralaringee limitrofe alla laringe;
- T3 se limitato alla laringe con fissità delle corde vocali o invasione dell'area retrocricoidea, dello spazio pre-epiglottico o dello spazio paraglottico;
- T4a se la neoplasia oltrepassa la cartilagine tiroidea e/o infiltra i tessuti extralaringei, cioè i muscoli prelaringei, gli estrinseci della lingua, la tiroide, la trachea e l'esofago;
- T4b se interessa gli spazi prevertebrali, avvolge la carotide interna o infiltra le strutture mediastiniche.

In caso di localizzazione glottica invece si ha:

- T1a, in cui la neoplasia interessa una sola corda vocale ma con motilità cordale conservata;
- T1b: la neoplasia raggiunge la commisure anteriore o l'altra corda vocale ma con motilità cordale conservata;
- T2, in cui il tumore si estende, cranialmente o caudalmente, mantenendo una motilità cordale anche se ridotta;
- T3, se limitato alla laringe con fissità cordale e/o invasione dello spazio paraglottico e/o minima erosione della cartilagine tiroidea
- T4a, se la neoplasia oltrepassa la cartilagine tiroidea e/o infiltra i tessuti extralaringei, cioè i muscoli prelaringei, gli estrinseci della lingua, la tiroide, la trachea e l'esofago;

- T4b se interessa gli spazi prevertebrali, avvolge la carotide interna o infiltra le strutture mediastiniche uguale a carcinoma sovraglottico. (gli ultimi due punti sono uguali al carcinoma sovraglottico).

Il tumore sottoglottico prevede invece:

- T1: tumore limitato a una sede della sottoglottide;
- T2: tumore esteso alle corde vocali con normale o ridotta mobilità;
- T3: tumore limitato alla laringe con fissità cordale;
- T4a e T4b uguali a carcinoma sovraglottico e glottico.

Per quanto riguarda il parametro N esso è uguale per tutti i tipi di lesione e si divide:

- N0: non vi sono metastasi latero-cervicali;
- N1: c'è un unico linfonodo patologico con diametro inferiore a 3cm;
- N2: c'è un unico linfonodo omolaterale alla lesione che non sia di dimensioni superiori ai 6cm e non abbia una estensione extracapsulare della metastasi;
- N2a: c'è un unico linfonodo positivo di dimensioni inferiori ai 3cm che però sia ENE*-positivo, cioè che abbia un'estensione extracapsulare della metastasi; oppure un unico linfonodo con dimensioni comprese tra i 3cm e i 6cm senza estensione extracapsulare (ENE-negativo);
- N2b: multipli linfonodi omolaterali alla lesione senza un'estensione della neoplasia al di fuori della capsula del linfonodo (ENE-negativo);
- N2c: multipli linfonodi bilaterali o controlaterali con dimensioni inferiori ai 6cm;
- N3a: unico linfonodo con dimensioni superiori ai 6cm senza progressione al di fuori della capsula della metastasi (ENE-negativo);
- N3b: qualsiasi linfonodo con dimensioni superiori ai 3cm ENE-positivo.

**estensione extranodale*

Il parametro M invece si limita a definire l'assenza (M0) o presenza (M1) di metastasi a distanza.(21).

2.1.6 Terapia

Per quanto riguarda la terapia, si cerca di essere meno demolitivi possibile, in quanto in base a questa scelta il paziente potrà o meno mantenere (o almeno parzialmente) una buona deglutizione e normali funzioni fonatorie e respiratorie, fondamentali per una buona qualità di vita(15). In particolare, prima di iniziare l'iter terapeutico vanno prese in considerazione molte variabili, come le caratteristiche biologiche del tumore (istotipo, grading, mutazioni come p53), la sua sede di presentazione, i parametri T e N e l'eventuale presenza di metastasi a distanza(22).

2.1.7 Trattamento chirurgico

In caso di lesioni early il trattamento chirurgico riesce a garantire una buona prognosi senza compromettere eccessivamente la qualità di vita del paziente. Soprattutto a livello glottico la prognosi risulta particolarmente favorevole, dato che qui la neoplasia è in genere diagnosticata più precocemente e la zona è meno ricca di vasi linfatici, per cui anche la diffusione linfonodale risulta esser minore rispetto alle altre sedi(4).

Storicamente la chirurgia si serviva di un approccio open (cordectomia per laringofissura); ultimamente si preferisce invece un approccio mininvasivo mediante endoscopia rigida ed exeresi con strumento laser: questo approccio si è rivelato equivalente alla terapia demolitiva in caso di lesioni non particolarmente estese (fino a T2-N0)(4). In presenza di condizioni anatomiche sfavorevoli all'endoscopia, controindicazioni alla chemio-radioterapia o come opzione di salvataggio dopo trattamento medico ci si può servire della chirurgia conservativa a cielo aperto, la quale garantisce la radicalità del trattamento chirurgico a fronte di una maggiore preservazione d'organo rispetto la laringectomia totale(23). In questo contesto si parla di laringectomia parziale orizzontale (OPHL), la quale viene divisa in tre sottotipi:

- Tipo 1, sovraglottica, che prevede l'asportazione di tutta la porzione laringea al di sopra del piano glottico, compreso lo spazio preepiglottico e la metà superiore della cartilagine tiroidea;

- Tipo 2, sovracricoidea, in cui viene asportata tutta la laringe che si trova al di sopra la cartilagine cricoidea. È ulteriormente suddivisa in tipo a se viene asportata solo l'epiglottide sottoioidea e b se invece viene asportata tutta l'epiglottide. Tale procedura può comprendere o meno la rimozione delle aritenoidi;
- Tipo 3, sovratracheale, che prevede la rimozione della cartilagine cricoide, ma con risparmio di un'unità crico-aritenoidea (necessaria per la deglutizione). Anche tale procedura può essere divisa in tipo a o b a seconda che sia rimossa solo l'epiglottide sottoioidea o tutta(23).

Qualora le tecniche conservative non fossero sufficienti per ottenere una radicalità adeguata la tecnica chirurgica da adottare è la laringectomia totale(24). Nello specifico essa è indicata:

- quando vi è una estensione importante della neoplasia tale da fuoriuscire dallo scheletro cartilagineo (T3 non passibili di protocolli di preservazione d'organo non chirurgici);
- quando ad essere coinvolta dalla neoplasia non è più solo la laringe a livello transglottico (cioè a tutti i livelli della laringe) ma anche l'ipofaringe (T4 per infiltrazione massiva dello scheletro cartilagineo o estensione ipofaringea);
- quando ci troviamo di fronte ad un fallimento di una chirurgia o di un trattamento di preservazione d'organo radio-chemioterapico;
- in caso di sequele funzionali post trattamento chirurgico o radioterapico(24).

In questo caso il paziente necessiterà di tracheostomia a permanenza. Attraverso la riabilitazione i pazienti sottoposti a laringectomia totale possono riprendere la funzione fonatoria. Ciò può avvenire con il posizionamento di una protesi tracheo-esofagea; imparando ad utilizzare la cosiddetta voce esofagea, cioè una voce autonoma prodotta in condizioni di apnea; oppure con apparecchi elettronici come il laringofono(4).

2.1.8 Trattamenti non chirurgici

In carcinomi piccoli, soprattutto a livello glottico ma anche sovraglottico la radioterapia si è visto garantire un risultato praticamente sovrapponibile alla chirurgia conservativa, per cui si presenta come una valida alternativa nei casi ben selezionati(4,7,8) In più, il trattamento radioterapico (con chemioterapia concomitante o meno) può essere preso in considerazione come terapia di salvataggio nel caso di recidiva post intervento chirurgico. Nello specifico è indicato in caso di: margini chirurgici *close* (definiti come inferiore a 1 mm)(25); stadio pT4; invasione delle strutture nervose, linfatiche o vascolari; presenza di tre o più linfonodi metastatici o stadio N3; diffusione extracapsulare e infine se la lesione primaria si estende nell'area subglottica(7,26).

Un approccio combinato radio-chemioterapico può essere utilizzato in prima istanza anche nei tumori localmente avanzati (eccetto T4 con infiltrazione della cartilagine tiroidea a tutto spessore o infiltrazione >1 cm della base della lingua; scarso performance status e quindi impossibilità di eseguire una CT-RT): il risultato in termini di sopravvivenza è paragonabile a quello chirurgico, con il vantaggio di una maggiore preservazione delle funzionalità dell'organo e possibilità di ricorrere all'intervento chirurgico come trattamento di un'eventuale recidiva di malattia. Tuttavia, si deve sottolineare che la chirurgia dopo CT-RT è gravata da un'alta percentuale (14%) di complicanze post-operatorie gravi, soprattutto fistole faringo-cutanee e con modeste probabilità di successo(27).

La chemioterapia [cisplatino in monoterapia o in associazione con 5-fluorouracile(28)] è stata utilizzata in un primo momento solo nei pazienti che presentavano metastasi alla diagnosi o come terapia palliativa in ricorrenza di malattia(29); mentre non viene utilizzata come trattamento di induzione nei casi localmente avanzati dato che gli studi non ne hanno identificato l'efficacia(28).

2.1.9 Trattamento metastasi linfonodali cervicali

Nel caso di pazienti con evidenza clinica di metastasi linfonodali si può optare per uno svuotamento radicale dei linfonodi del collo o per uno svuotamento radicale modificato (come in quella radicale vengono rimossi tutti i livelli linfonodali -dall'I al V-, ma in questo caso viene preservata almeno una tra le strutture non linfatiche, ossia il muscolo sternocleidomastoideo, il nervo accessorio spinale e la vena giugulare interna) (30).

In caso di collo clinicamente N0 le opzioni a disposizione sono: lo svuotamento linfonodale elettivo, la radioterapia o l'approccio “*wait and see*” con l'intervento chirurgico di salvataggio(7). Lo svuotamento linfonodale elettivo è necessario qualora ci sia un rischio di metastasi occulte maggiore del 20%(31). Con svuotamento elettivo si fa riferimento ad un insieme di differenti tecniche chirurgiche, tra le quali spicca lo svuotamento linfonodale selettivo (una volta ci si serviva dello svuotamento radicale modificato ma ad ora è considerato un *overtreatment*)(32). Tale trattamento selettivo (in cui vengono risparmiate una o più stazioni linfonodali del collo) (30) è diventato dunque il *gold standard* nei pazienti con collo clinicamente negativo. Nel caso di riscontro intraoperatorio di metastasi linfonodali il trattamento è il medesimo di chi ha metastasi linfonodali alla diagnosi clinica.(7)

2.1.10 Farmaci biologici

Come per tutte le neoplasie solide e non solo anche in questo contesto ha preso piede l'utilizzo di farmaci biologici, utilizzati sia in alternativa che in sostituzione alla chemioterapia tradizionale.

Uno studio clinico randomizzato di fase III ha valutato l'impiego di un anticorpo monoclonale anti EGFR (cetuximab) in associazione sincrona con la RT (sia standard che a frazionamenti non convenzionali), dimostrando maggiore efficacia rispetto alla radioterapia da sola in termini di controllo locoregionale a 3 anni e di sopravvivenza globale a 5 anni. Il vantaggio è indipendente dallo stadio (III vs IV) e dalle sedi di malattia (valutava le neoplasie di testa collo in generale)(33).

Da confronti indiretti il trattamento combinato con cetuximab+RT presenterebbe un profilo di tossicità più favorevole rispetto a quello della combinazione contenente chemioterapia, anche se tale dato non ha trovato pieno riscontro in successive osservazioni(4).

In un'altra analisi comprendente 168 pazienti affetti da carcinoma della laringe ed ipofaringe candidabili a preservazione d'organo, il cetuximab ha garantito una migliore preservazione laringea, sebbene non sia emersa una differenza statisticamente significativa in paragone alla sola RT. Nonostante i limiti di questa analisi (il ristretto numero di pazienti inclusi), la combinazione di cetuximab/RT potrebbe essere un'opzione da considerare in pazienti unfit per cisplatino. Purtroppo, il braccio di controllo di questo studio non era rappresentato da chemio e radioterapia concomitante(34).

Al contrario, una revisione della letteratura che ha incluso principalmente dati relativi a casi studiati in maniera retrospettiva, ha ipotizzato la superiorità della chemioradioterapia a base di platino rispetto al cetuximab, in termini di controllo locale, sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale(35). Non vi sono dati sull'uso di cetuximab in combinazione con RT postoperatoria se non in studi di fase II(36).

Tre studi randomizzati hanno valutato il ruolo di panitumumab in associazione con RT o con RT e cisplatino, senza fornire evidenza a favore dell'uso del biologico(37).

L'utilizzo di afatinib dopo chemioradioterapia quale trattamento adiuvante (dopo trattamento concomitante) in pazienti a rischio intermedio-alto non ha dimostrato vantaggio rispetto al placebo in termini di sopravvivenza libera da malattia (obiettivo primario dello studio) e lo studio è stato chiuso per questa mancanza di risultati(38). Inoltre uno studio randomizzato su circa 700 casi non ha dimostrato alcuna utilità di lapatinib dopo chemioradioterapia postoperatoria rispetto al placebo(39).

2.1.11 Follow-up

La pianificazione del follow-up dovrebbe tenere conto delle caratteristiche del singolo individuo e dal rischio di ricorrenza di malattia. Le sue finalità al termine dei trattamenti oncologici sono diverse: la sorveglianza dalla comparsa di recidive; la valutazione degli effetti sub-acuti e tardivi dei trattamenti; il ripristino dello stato nutrizionale, delle funzioni deglutitorie e fonatorie; il monitoraggio dello stato psicosociale del paziente e se, se possibile, l'astinenza dai fattori di rischio della malattia (alcol e fumo in primis)(40).

Nello specifico, il follow-up si articola in:

- Visite periodiche da parte dell'otorinolaringoiatra durante la radioterapia per tutti quei pazienti con difficoltà nella deglutizione o nella respirazione
- RX del torace ogni anno
- Indici epatici di laboratorio, da ripetere ogni anno, per coloro che si presentano alla diagnosi con uno stadio avanzato di malattia
- visite periodiche da parte dell'oncologo che ha effettuato la radioterapia
- test di funzionalità tiroidea per chi è stato sottoposto a trattamento radioterapico nella parte inferiore del collo.

La frequenza delle visite non è standardizzata e può essere personalizzata; in genere, nel primo anno al termine di ogni protocollo di trattamento si visitano i pazienti ogni 1-3 mesi; nel secondo anno si aumenta ogni 2-4 mesi; al terzo ogni 3-6 mesi; nel quarto e quinto anno ogni 4-6 mesi per poi rivedere il paziente una volta all'anno(7).

2.2 Microambiente tumorale

2.2.1 Transizione epitelio-mesenchimale e CAFs

Nei campioni tissutali di carcinoma, oltre alle cellule epiteliali maligne, è presente una componente stromale (costituita da fibroblasti, miofibroblasti, cellule endoteliali, periciti, cellule muscolari lisce e adipociti), che si è dimostrata fondamentale per la proliferazione e la crescita delle cellule carcinomatose (41–44).

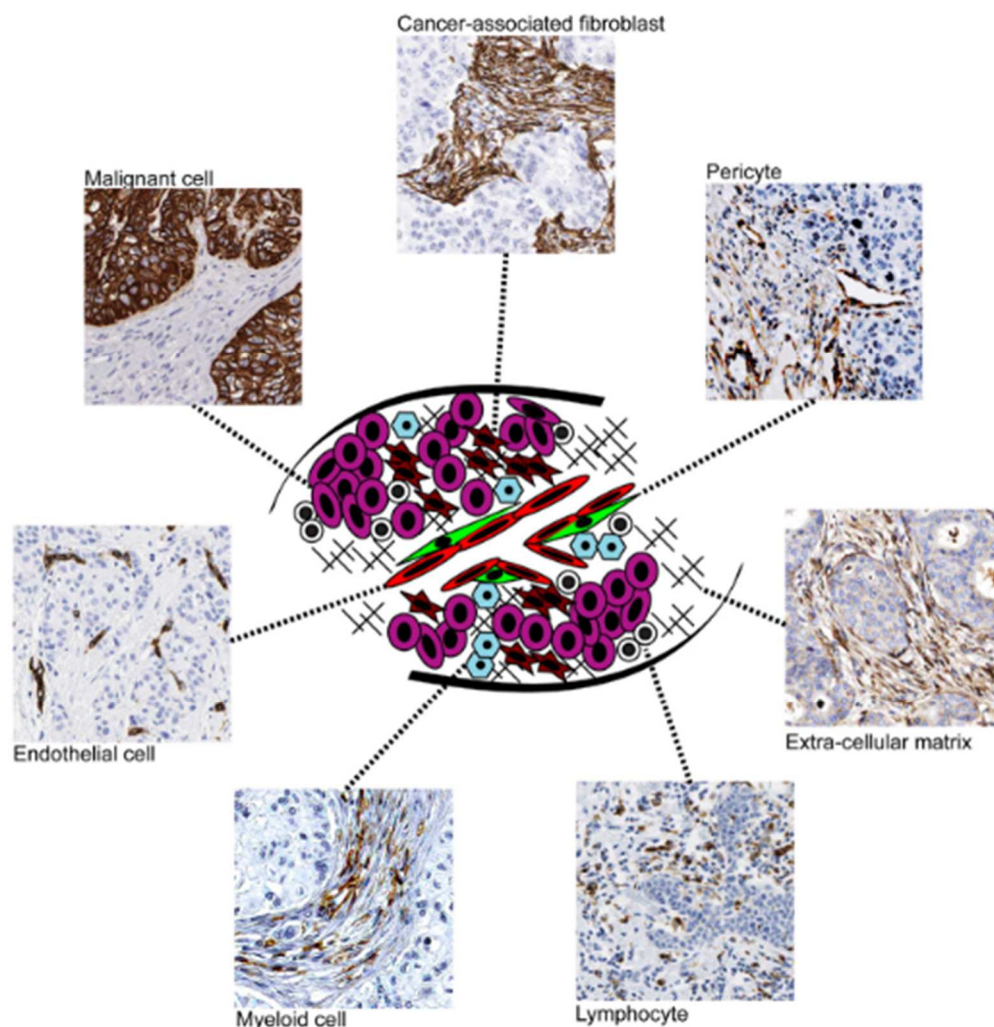


Figura 2: rappresentazione schematica delle varie popolazioni cellulari costituenti il microambiente tumorale, ciascuna marcata con una differente colorazione immunohistochimica. In particolare i marcatori utilizzati sono: la citocheratina 14 per le cellule tumorali; l'alfa-SMA per i CAFs; il recettore del PDGF-beta per i periciti; il collagene 1a1 per la matrice extracellulare; il CD-45 per i linfociti; il CD-11c per le cellule della linea mieloide e il CD-34 per le cellule edoteliali. (43).

Non è ancora ben chiaro se sia il tessuto sano attorno al tumore a produrre, in relazione alla presenza di quest'ultimo, la componente stromale o se sia il tumore stesso ad indurre la formazione tramite la produzione di specifici fattori di crescita. In particolare, la produzione da parte della neoplasia di queste molecole sembra indurre le cellule epiteliali a compiere la transizione epitelio-mesenchimale (EMT), grazie al quale dismettono la loro caratteristica morfologica e il loro profilo normale di espressione genica, assumendo una forma e un programma trascrizionale tipico delle cellule mesenchimali (un po' come avviene per la guarigione delle ferite (45). Nello specifico le cellule perdono di polarità, l'espressione di citocheratine e la presenza di giunzioni strette mediate dall'E-caderina mentre acquistano un fenotipo mesenchimale, motilità, invasività, aumentata resistenza all'apoptosi, l'espressione di N-caderina e la capacità di secernere proteinasi (MMP-2 e 9).

Affinchè si verifichi tale transizione sono necessari una serie di stimoli biochimici che devono essere forniti dal tumore e rilasciati nell'ambiente circostante. In tale contesto si inseriscono i CAFs, ossia i fibroblasti associati al cancro(46). L'origine di tali cellule è affascinante ed è un chiaro esempio di come la neoplasia impari a sfruttare i meccanismi fisiologici a proprio favore. I fibroblasti normali, se sottoposti a particolari segnali biochimici come fattori di crescita (TGF-beta, FGF, chemochine) o prodotti dell'esposizione a stress cellulare (come l'ipossia, lo stress ossidativo o le radiazioni), rispondono con una modifica morfologica, biochimica e funzionale, diventando NAFs (fibroblasto normalmente attivato). Queste cellule hanno una forma stellata, esprimono l'actina muscolare liscia (SMA), la vimentina, proteine di superficie (quali VCAM E ICAM) e secernono metalloproteasi, fattori di crescita, citochine ed altre molecole segnale, in modo da agire sulla matrice extracellulare. Un esempio è ciò che avviene in caso di ferita: in tal caso l'infiammazione, l'intervento del sistema immunitario e il rilascio di particolari fattori di crescita promuovono una trasformazione del microambiente che favorisce la guarigione(47). Nel caso in cui però tali stimoli persistano (come ad esempio nel cancro, in cui il tumore addirittura continua a crescere), la risposta non è più puntuale ma diventa costitutiva: i NAFs diventano così CAFs. La loro attività non cambia, ma presentano delle modificazioni epigenetiche per cui non possono più regredire allo stato di fibroblasto normale, continuando dunque costitutivamente a secernere sostanze capaci di rimodellare il microambiente circostante (48).

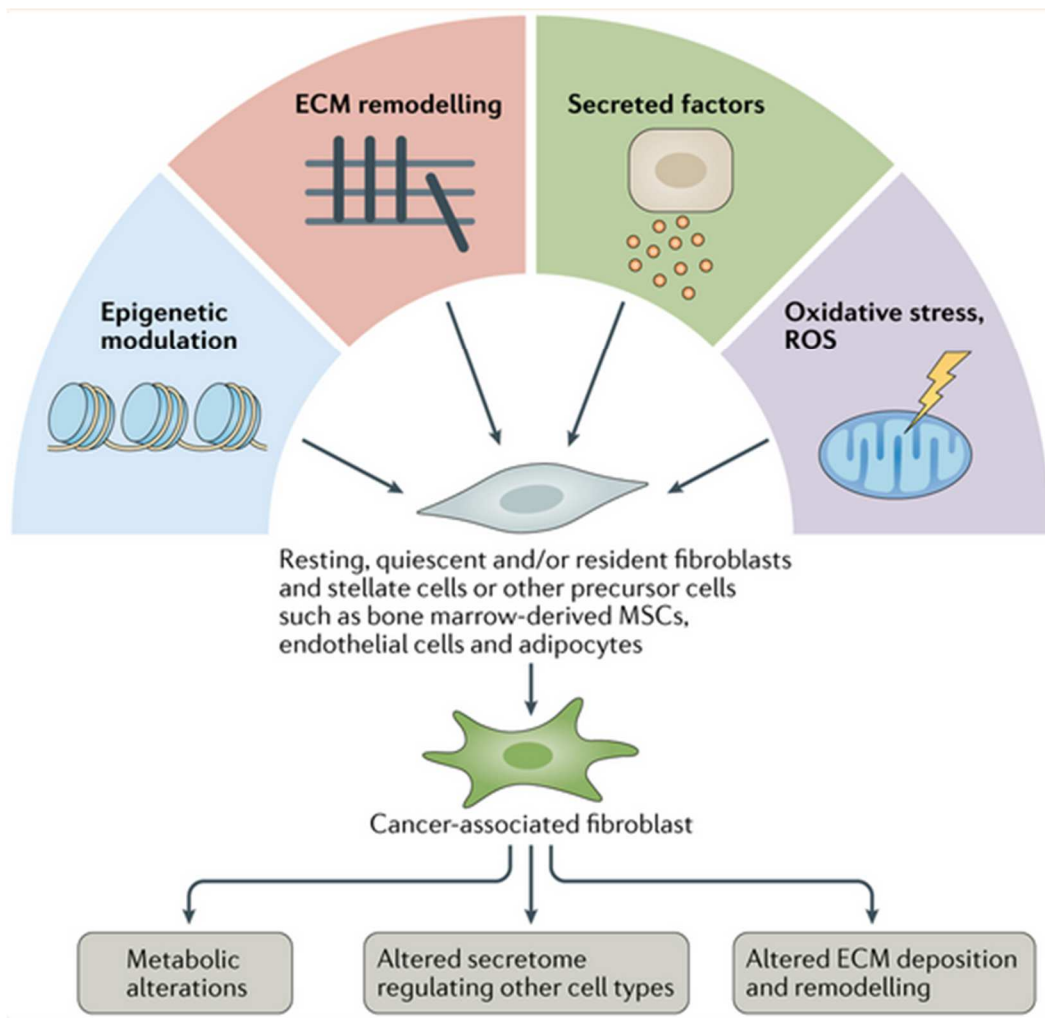


Figura 3: Illustrazione schematica dei vari meccanismi coinvolti nell'attivazione dei CAFs. (48).

Tali CAFs sono comunque diversi dai fibroblasti fisiologici in quanto non posseggono una funzione riparativa o trofica, ma agiscono favorendo la proliferazione del tumore attraverso una modulazione della polarizzazione immunitaria, la produzione di fattori di crescita e di proteine di matrice extracellulare (46). In più, va ricordato il loro fondamentale ruolo di manipolazione biochimica dell'ambiente tumorale per cui viene favorito il metabolismo delle cellule neoplastiche (soprattutto lattacidico); allo stesso tempo, veicolando i nutrienti (lattati, chetoni, acidi grassi liberi e amminoacidi come la glutammina) e mettendoli a disposizione del tumore impoveriscono lo stroma di tutte le altre sostanze di cui si servirebbero i linfociti per sopravvivere (49). Questo dato non è però altrettanto valido nel carcinoma pancreatico, in cui si è dimostrato che i CAFs posseggano un ruolo soppressivo nei confronti della neoplasia stessa(50).

In questo contesto, studi recenti evidenziano anche un ruolo importante dei microRNA (miR), regolatori pleiotropici dell'espressione genica, come componenti critici del microambiente tumorale. È stato riportato come la deregolazione dell'espressione di miR nel sito del tumore influisca sulla progressione e sulla metastasi del tumore e che le cellule tumorali siano dotate della capacità di produrre alcune classi di miR, come miR21 e miR29a. Queste piccole sequenze di RNA non codificanti vengono poi interiorizzate dagli esosomi e secrete all'esterno della cellula, alterando il meccanismo trascrizionale e diffondendosi allo stesso tempo nell'ambiente tumorale. Tutte le cellule immunitarie che esprimono i TLR-8, come le DC, sono potenzialmente esposte a questo scenario: pertanto i miR possono essere visti come componenti integrati del letto tumorale, agendo come fattori biologici paracrini che contribuiscono alla diafonia tra cancro e cellule immunitarie, insieme alla rete di citochine ivi generate (44).

Per tutti questi motivi non stupisce che un contenuto elevato di stroma tumorale sia associato a una sopravvivenza peggiore e ad un alto livello di interazione tra cellule tumorali e stromali (51). Inoltre, è stato visto che i tumori ad alto contenuto di stroma tumorale sono associati a una debole risposta linfocitaria suggerendo come una forte risposta immunitaria possa prevenire lo sviluppo dello stroma tumorale minimizzando aggressività del tumore (52). Molti studi sul cancro della testa e del collo hanno mostrato una significativa correlazione tra un alto contenuto di stroma tumorale e una maggiore aggressività, inclusa l'invasione perineurale (53), profondità di infiltrazione (54–56) invasione cellula-cellula (56), stadio avanzato e resistenza al trattamento(52).

2.2.2 TSR

Nei tumori di testa e collo è stata evidenziata una correlazione tra la presenza di EMT e la presenza di una maggiore quantità di stroma a livello istologico (57). Il TSR è un'entità relativamente nuova ed è stata descritta per la prima volta da Mesker et al nel 2007 come fattore prognostico nel carcinoma del colon-retto; tuttavia, ora, il suo significato prognostico è stato studiato in vari carcinomi tra cui esofageo, seno, endometriale, epiteliale ovarico, cervicale, laringeo, carcinoma nasofaringeo ed epatico(58). Un tumore viene definito povero

di stroma qualora il TSR sia superiore al 50%; viceversa è ricco di stroma qualora il TSR sia maggiore del 50%(59,60).

2.2.3 Utilizzo del TSR come marcatore prognostico nelle neoplasie solide

Oltre ad essere un valido fattore prognostico per molte neoplasie (61–64)(come già detto in precedenza, dando risultati simili anche per il distretto testacollo) (54,56,63,65,66), possiede il vantaggio di essere una metodica rapida ed economica, dato che i campioni possono essere analizzati semplicemente in ematossilina-eosina senza dover impiegare particolari marcatori immunoistochimici che, oltre ad essere particolarmente costosi, non sono sempre disponibili in tutte le aziende ospedaliere. Per questo motivo la valutazione del TSR potrebbe entrare nella pratica clinica sia per la sua affidabilità, capacità prognostica quanto per il suo rapporto costo-efficacia(67).

2.3 Ruolo del sistema immunitario

2.3.1 Interazione tra sistema immunitario e tumore

Il sistema immunitario possiede un ruolo fondamentale nella prevenzione della trasformazione maligna di un tessuto (immunosorveglianza)(68): molti studi hanno ormai dimostrato come in vari carcinomi trovare un'intensa risposta linfocitica sia associata ad una prognosi migliore. Per di più, sembra che il risultato prognostico individuato andando a cercare l'infiltrato linfocitario sia più affidabile in termini di prognosi rispetto alla tradizionale classificazione TNM(69) e che, una maggiore presenza di linfociti sia associata ad una migliore risposta alla chemioterapia neoadiuvante nei carcinomi di testa e collo(70). Al contrario, una minor concentrazione di macrofagi è associata ad una risposta migliore alla chemioterapia (71).

Tutto ciò non stupisce più da quando si è scoperto che il sistema immunitario sorveglia non solo la presenza di agenti infettivi, ma anche le cellule normali. Infatti esso attacca non solo i patogeni, ma anche le cellule che, per qualche motivo, hanno subito un certo tipo di modifica. In particolare, i linfociti CD8⁺ sono in grado di riconoscere una produzione aberrante di proteine: in quelle cellule i prodotti alterati vengono degradati nei proteasomi; i frammenti che ne derivano vengono esposti sulla superficie cellulare grazie ai MHC (complessi maggiori di istocompatibilità) di classe I (è lo stesso meccanismo con cui vengono riconosciute le proteine virali) e così riconosciuti dai linfociti citotossici(72). Purtroppo però il segnale del MHC di classe I spesso non è sufficiente, dato che le cellule tumorali non esprimono gli altri ligandi stimolatori capaci di attivare la risposta linfocitaria. Si pensa infatti che l'attivazione del sistema immunitario sia possibile solo qualora tali antigeni mutati siano captati dalle APC (*Antigen Presenting Cell*), le quali possono indurre una proliferazione linfocitaria(73). In questo contesto si è rilevato utile classificare gli antigeni tumorali in due macro-categorie: gli antigeni tumore-specifici e gli antigeni tumore correlati. Nella prima categoria vengono incluse le proteine mutate della cellula tumorale, ossia mutazioni puntiformi che acquista il tumore e che quindi sono specifiche esclusivamente di quella neoplasia (si ritiene che tali mutazioni siano riconoscibili da parte del sistema immunitario, per cui hanno destato particolare interesse tra i ricercatori). Gli antigeni tumore correlati invece sono una

serie di proteine caratteristiche della cellula normale ma che nella cellula neoplastica sono over espresse o neo prodotte, ovvero prodotte da un gene che dovrebbe essere spento in quella cellula. Fanno da esempio Her2/neu nel carcinoma mammario, l'alfa-feto proteina nei tumori epatici e il CEA in quelli del colon(74)

Molti tumori maligni però sviluppano meccanismo che permettono di eludere le risposte tumorali dell'ospite oppure di resistervi. La pressione selettiva indotta dalla risposta immunitaria porta a selezionare le cellule dotate di ridotta immunogenicità; nello specifico, le cellule tumorali riescono a sfuggire al riconoscimento perdendo l'espressione degli antigeni; oppure con mutazioni nei geni dell'MHC o di altri geni necessari al processamento dell'antigene; tramite la produzione diretta di proteine immunosoppressive o, infine, sfruttando proteine inibitorie di membrana. Tale processo è definito *immunoediting* tumorale(74).

2.3.2 I recettori inibitori: CTLA-4 e PD-L1

Tra i recettori inibitori di membrana troviamo i complessi CTLA-4/ B7 e PD-1/PD-L1.

CTLA-4 è un membro della famiglia di CD-28 che si lega alle molecole B7. Esso svolge due azioni importanti: pone fine all'attivazione continua dei linfociti T che rispondono all'antigene e blocca l'attivazione dei linfociti T naive grazie all'azione dei T regolatori(75). I meccanismi con cui agisce a livello molecolare sono sostanzialmente 2:

- blocco della trasduzione del segnale, tramite il reclutamento di una fosfatasi che agisce sulle molecole coinvolte nella trasduzione del segnale del TCR e CD28, interrompendone l'azione;
- riduzione della disponibilità di B7, prevenendone il legame con CD28 e inducendone l'endocitosi (da parte delle APC).

L'importanza di tale via è stata studiata mediante topo knockout per il gene CTLA-4, nei quali è stata osservata una mancanza della tolleranza periferica e una grave patologia ad opera dei linfociti T che ricorda quella delle malattie autoimmuni(76).

Una funzione analoga è svolta dalla proteina di morte cellulare programmata 1 (PD-1, così chiamata perché in origine si riteneva erroneamente che

fosse implicato nella morte programmata dei linfociti T). PD-1, indicato anche come CD279, è una proteina transmembrana da 55 kDa contenente 288 aminoacidi con un dominio N-terminale extracellulare (IgV-Like), un dominio permeante la membrana e una coda citoplasmatica situata rispettivamente alle estremità N e C, con due basi di tirosina(77).

Tale molecola è un inibitore della risposta immunitaria sia adattativa che innata ed è espressa sui linfociti T attivati, *natural killer* (NK) e B, macrofagi, cellule dendritiche (DC) e monociti; inoltre è stato visto che PD-1 è altamente espresso anche sulle cellule T tumore-specifiche(78). Fattori di trascrizione come il fattore nucleare delle cellule T attivate (NFAT), NOTCH, *Forkhead box protein* (FOX) O1 e il fattore di regolazione dell'interferone (IFN) 9 (IRF9) possono innescarne la trascrizione; allo stesso modo le regioni regolatorie a monte conservate B e C (CR-B e COR-C) sono importanti per la sua espressione. C'è un sito di legame nella regione CR-C che è collegato a NFATc1 (NFAT2) nelle unità TCD4 e TCD8; mentre c-FOS si collega a siti nella regione CR-B e migliora l'espressione di PD-1 quando stimola i recettori delle cellule T al rilevamento di Ag in cellule T naive. Durante le infezioni croniche, il PD-1 è espresso nelle cellule TCD8 esaurite a causa del suo promotore demetilato e il fattore di trascrizione FOXO1 si lega al promotore PD-1 per aumentarne l'espressione; la perdita di cellule cancerose aumenta l'espressione della subunità c-FOS di AP1, aumentando così l'espressione di PD-1 (79).

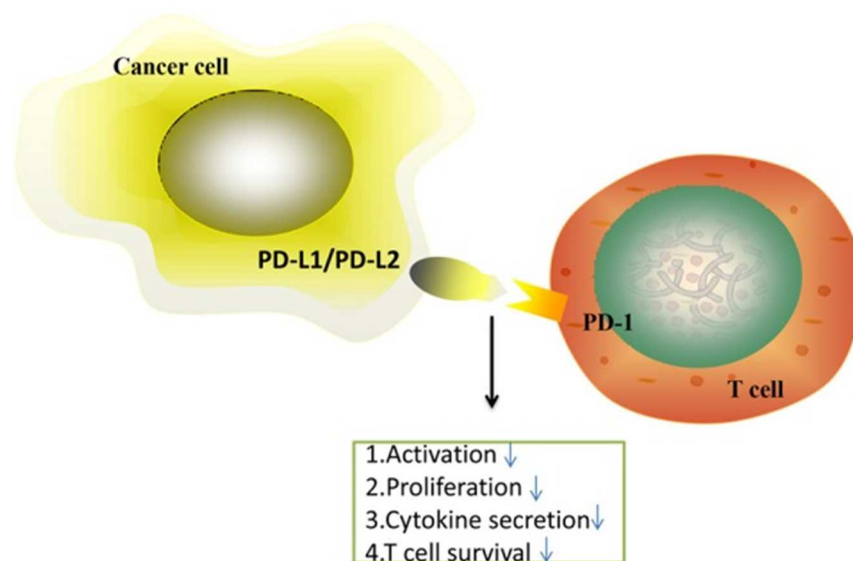


Figura 4: azione di PD-L1 sulle cellule del sistema immunitario(79)

PD-1 svolge due ruoli opposti, poiché può essere sia benefico che dannoso. Per quanto riguarda i suoi effetti benefici, svolge un ruolo chiave nel ridurre la regolazione delle risposte immunitarie inefficaci o dannose e nel mantenere la tolleranza immunitaria; d'altro canto, con lo stesso meccanismo previene l'eliminazione da parte del sistema immunitario delle cellule tumorali capaci di esprimerlo sulla membrana(79).

Tale molecola si lega al ligando di morte cellulare programmata 1 (PD-L1; indicato anche come CD279 e B7-H1), una glicoproteina transmembrana di tipo 1, appartenente alla serie B7, da 33 kDa e contenente 290 aminoacidi con domini Ig- e IgC nella sua regione extracellulare(80).

PD-L1 è solitamente espresso da macrofagi, da alcune cellule T e B attivate, dalle cellule dendritiche e da alcune cellule epiteliali, in particolare in condizioni infiammatorie(81). Inoltre, PD-L1 è espresso dalle cellule tumorali come un meccanismo immunitario adattativo per sfuggire alle risposte antitumorali(82).

In pratica, una stimolazione immunitaria persistente induce i linfociti T a produrre INF-gamma; se la cellula tumorale possiede il recettore per tale citochina, c'è una attivazione della via JAK1/JAK2-STAT1/STAT2/STAT3-IRF1(83). Questa cascata porta all'attivazione del promotore di PD-L1, il quale così inizia ad essere esposto e blocca l'attivazione linfocitaria.

Tale ligando viene considerato un fattore co-inibitore della risposta immunitaria: combinandosi con PD-1 riduce la proliferazione delle cellule PD-1 positive, inibisce la loro secrezione di citochine e ne induce l'apoptosi: in questo modo svolge un ruolo importante in vari tumori maligni, attenuando la risposta immunitaria dell'ospite alle cellule tumorali. A conferma di ciò è stato visto il targeting del PD-L1 è stato associato a una risposta clinica significativa in un'ampia gamma di pazienti oncologici(84); inoltre agisce come fattore pro-tumorigeno attivando vie di segnalazione proliferativa e di sopravvivenza nelle cellule neoplastiche(85).

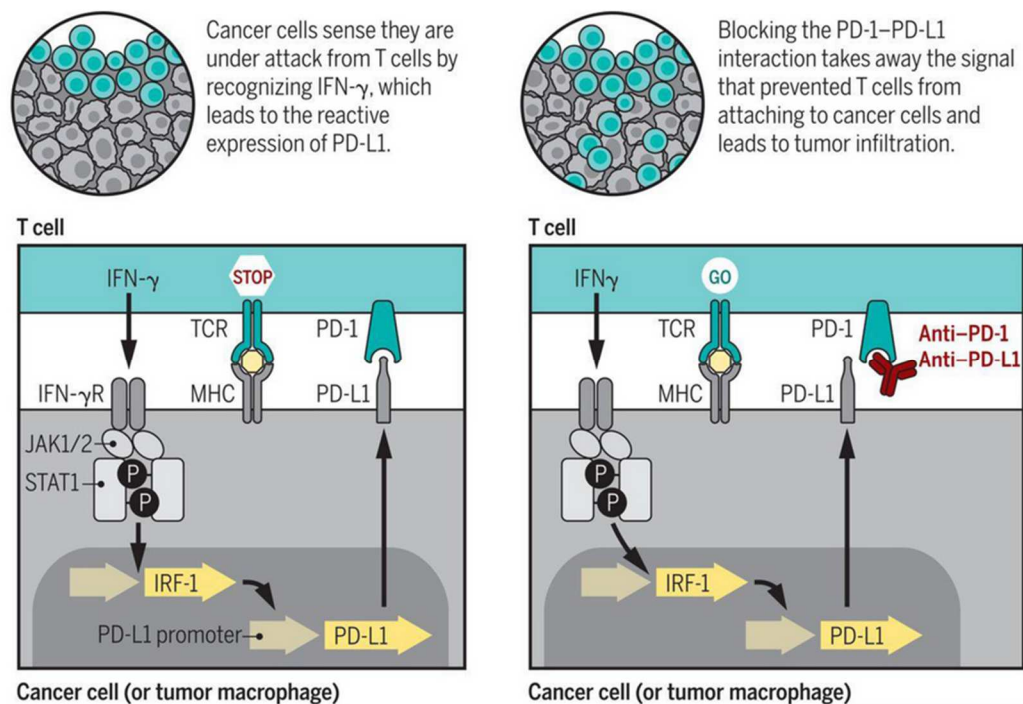


Figura 5: Meccanismo d'azione della terapia di blocco del PD-1. A sinistra) il riconoscimento del recettore delle cellule T (TCR) dell'antigene affine presentato dalle molecole MHC sulla superficie delle cellule tumorali provoca l'attivazione delle cellule T. Le cellule T producono quindi interferone-gamma e altre citochine. Le cellule tumorali e altre cellule nel microambiente tumorale hanno recettori gamma dell'interferone che segnalano attraverso le Janus chinasi 1 e 2 (JAK1 e JAK2), che fosforilano e attivano trasduttori di segnale e attivatori di proteine di trascrizione (STAT) che dimerizzano e attivano una serie di geni di risposta all'interferone, incluso il fattore di regolazione dell'interferone 1 (IRF-1), che si lega al promotore di PD-L1 portando alla sua espressione superficiale. L'espressione reattiva di PD-L1 disattiva le cellule T che stanno cercando di attaccare il tumore e queste cellule T rimangono ai margini del cancro. A destra) Il blocco dell'interazione PD-1:PD-L1 con gli anticorpi terapeutici provoca la proliferazione e l'infiltrazione delle cellule T nel tumore, inducendo una risposta citotossica delle cellule T che porta a una risposta obiettiva del tumore(75).

2.3.3 Immunoterapia basata sulla via PD-1/PD-L1

La biologia unica e i tassi di risposta duraturi nei pazienti con più tipi di cancro indicano che il blocco terapeutico del percorso PD-1 è probabilmente uno dei progressi più importanti nella storia del trattamento delle neoplasie(75). Attualmente ci sono cinque anticorpi anti-PD-1 o anti-PD-L1 approvati dalla FDA in 11 indicazioni di cancro. La prima prova dell'attività antitumorale del blocco PD-1 è stata offerta da nivolumab (anticorpo monoclonale completamente umano che inibisce l'interazione tra PD-1 e PD-L1(86). Tale anticorpo è stato somministrato

per la prima volta nel 2006 in uno studio di fase 1 e rappresenta il primo caso di blocco del PD-1 nell'uomo. Tra i 16 pazienti iniziali che hanno ricevuto nivolumab ogni 2 settimane, sei (37,5%) hanno avuto risposte obiettive al tumore, inclusi pazienti con melanoma, carcinoma a cellule renali e carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), a fronte di una tossicità limitata(87).

La presentazione dei dati di fase 1 con nivolumab ha innescato una rapida accelerazione dei piani di sperimentazione clinica con questo e altri anticorpi anti-PD-1 e anti-PD-L1. L'anticorpo anti-PD-1 pembrolizumab è entrato nei test clinici nel 2011. Con i dati clinici incoraggianti di nivolumab, lo sviluppo clinico di pembrolizumab si è concentrato su pazienti con melanoma metastatico e NSCLC(88,89).

Il primo anticorpo anti-PD-L1 approvato è stato atezolizumab per i tumori uroteliali nel 2016, seguito da avelumab per il carcinoma a cellule di Merkel nel 2017. Questa classe di agenti è stata la prima a ottenere l'approvazione della FDA basata su una caratteristica genetica rispetto al sito di origine del cancro, con l'approvazione di pembrolizumab e nivolumab per il trattamento di tumori microsatellitari instabili di qualsiasi origine nel 2017(90). Recentemente (2019) è stato approvato pembrolizumab in monoterapia o in combinazione con platino +5-fluorouracile come trattamento di prima linea per i pazienti con carcinoma della testa e del collo ricorrente o metastatico, PD-L1 positivi con CPS ≥ 1 (91).

La più alta attività antitumorale della terapia con un singolo agente di blocco del PD-1 è nel linfoma di Hodgkin, dove vi è un'espressione costitutiva di PD-L1 attraverso un'amplificazione comune del locus PD-L1 insieme a PD-L2 e JAK2 (92) , il carcinoma cutaneo a cellule di Merkel indotto da virus(93), tumori a instabilità dei microsatelliti con elevato carico mutazionale da deficit di riparazione del disadattamento che porta a un'alta frequenza di inserzioni/delezioni(90) e nel melanoma desmoplastico, un sottotipo raro di melanoma che ha un carico mutazionale molto elevato derivante da mutazioni puntiformi croniche indotte dalla luce ultravioletta(94). In questi casi, i tassi di risposta sono attualmente del 50-90%.Un secondo gruppo di tumori con tassi di risposta relativamente alti sono tumori indotti da cancerogeni, come le varianti più comuni di melanoma derivanti dalla pelle esposta in modo intermittente in cui i tassi di risposta anticipata sono attualmente compresi tra il 35 e il 40% e una serie di tumori associati agli effetti cancerogeni della sigarette come NSCLC, tumori della testa e del collo,

gastroesofageo e vescica/uroteliale, con tassi di risposta compresi tra il 25 e il 15%(95–97).

Il trattamento del cancro mediante il blocco del checkpoint immunitario (ICB) può portare benefici clinici di lunga durata, ma solo una frazione dei pazienti risponde al trattamento. Per prevedere la risposta alla terapia, è stato sviluppato il TIDE (*Tumor Immune Dysfunction and Exclusion*), un metodo computazionale per analizzare i due meccanismi primari di evasione immunitaria del tumore: l'induzione della disfunzione dei linfociti T nei tumori con elevata infiltrazione di linfociti T citotossici (CTL) e la prevenzione dell'infiltrazione dei linfociti T nei tumori con basso livello CTL(98). Come già affermato, la risposta con l'immunoterapia è più debole rispetto alle altre terapie oncogene mirate (in cui spesso purtroppo il tumore trova il modo di bypassare l'oncogene mirato), ma è comunque soggetta a refrattarietà primaria e resistenza acquisita dopo un periodo di risposta(99).

Un altro vantaggio nell'utilizzo dei *checkpoint inhibitors* è il profilo di tossicità relativamente favorevole, con tossicità che richiedono un intervento medico (grado 3–4) nell'intervallo del 10–15% nella maggior parte delle serie. La maggior parte dei pazienti trattati con un singolo agente anti-PD-1/PD-L1 non presenta tossicità rispetto a quanto ci si aspetterebbe dal placebo e i decessi correlati al trattamento sono molto rari. Pochissimi pazienti (~5%) interrompono la terapia a causa di tossicità. Gli eventi avversi correlati al trattamento più comuni di qualsiasi grado sono affaticamento, diarrea, eruzione cutanea e prurito nel 20-15% dei pazienti (88,100–102). In una percentuale minore, le tossicità sono più gravi e comprendono diverse endocrinopatie, in cui il sistema immunitario si infiltra in una ghiandola che produce ormoni e porta a disfunzioni permanenti che richiedono una terapia ormonale sostitutiva per tutta la vita, come disturbi della tiroide (10-15%), ipofisite, disturbi della ghiandola surrenale (1–3%) e diabete di tipo I (1%). Le tossicità infiammatorie gravi degli organi viscerali sono rare (~1%) ma possono interessare qualsiasi organo compreso il cervello (encefalopatia), le meningi (meningite), i polmoni (polmonite), il cuore (miocardite), il tratto gastrointestinale (esofagite, colite), il fegato (epatite), reni (nefrite), muscoli (miosite) e articolazioni (artrite)(75). Questi possono essere pericolosi per la vita. La pietra angolare del trattamento per le tossicità clinicamente rilevanti con la terapia di blocco sia del PD-1 che del CTLA-4 è la terapia immunosoppressiva, con alte dosi di

corticosteroidi e talvolta antagonisti del fattore di necrosi tumorale (TNF) (che sono controindicati nei pazienti con epatite) e micofenolato mofetile(103).

2.4 L'importanza di ricercare nuovi marcatori nel LSCC

I tumori della regione laringo-ipofaringea sono stati oggetto di studi clinici particolarmente importanti negli anni più recenti, nel tentativo di confermare la validità di un approccio terapeutico finalizzato alla conservazione dell'organo e della funzione. Ciò è naturalmente giustificato dal ruolo cruciale che questa regione anatomica svolge nel contesto della fisiologia e della vita relazionale(13). Come risultato di questo intenso sforzo di ricerca clinica, l'atteggiamento terapeutico nei confronti dei tumori della laringe è oggi dominato dalle terapie conservative: tali scelte hanno permesso ai pazienti di mantenere una migliore qualità di vita con (grazie ad una maggiore preservazione d'organo), ma a discapito di una sopravvivenza che non è aumentata nonostante lo sviluppo di nuove terapie sia mediche che chirurgiche sempre più efficaci (104). Probabilmente tale fenomeno è dovuto al fatto che interventi meno invasivi risultano a volte anche meno radicali, portando a ricomparsa di malattia.

Proprio in questo contesto così complesso come la laringe, dove il giusto equilibrio tra radicalità e preservazione d'organo gioca un ruolo davvero predominante per quella che sarà la qualità di vita del paziente(15), risulta fondamentale andare a ricercare dei nuovi marcatori, possibilmente analizzabili già alla biopsia (e non solo sul pezzo operatorio dove ormai sarebbe troppo tardi) e capaci di stratificare al meglio i pazienti in modo da poterli trattare adeguatamente, sempre in un'ottica multidisciplinare.

3 SCOPO DELLO STUDIO

Negli ultimi 30 anni, i tassi di sopravvivenza per i pazienti con carcinoma laringeo a cellule squamose non sono migliorati, nonostante l'introduzione di nuovi approcci chirurgici e l'adozione di strategie di chemioterapia e radioterapia (104,105). Pertanto, la ricerca patologica e oncologica sul LSCC (in particolare nelle forme più avanzate) si è concentrata su nuovi biomarcatori che potrebbero stratificare meglio la prognosi dei pazienti per consentire trattamenti appropriati e targeted (106–108).

Nell'ultimo decennio, l'interazione del tumore con lo stroma, il principale componente del microambiente, è stata ampiamente studiata a causa del suo ruolo fondamentale nei diversi stadi della tumorigenesi(109). Al fine di quantificare questa componente, studi recenti hanno identificato diversi parametri misurabili sulle sezioni istologiche, incluso il *tumor-stroma ratio* (TSR). La valutazione del TSR è una tecnica semplice ed economica, applicata su vetrini colorati con ematossilina ed eosina (H&E), per stimare la proporzione del tumore e del suo stroma circostante. Il metodo di valutazione del TSR è stato recentemente standardizzato ed è stato suggerito un valore di cut-off del 50% per stratificare i tumori con contenuto stromale basso o alto(67). Quest'ultimo è stato associato a una prognosi peggiore in diversi organi/siti maligne (110). TSR ha mostrato una buona riproducibilità inter-osservatore (67,110) e tutt'ora viene considerato un promettente fattore prognostico anche nei tumori del distretto testa-collo (53), incluso il carcinoma della laringe (111–113).

Allo stesso modo, il cross-talk tra cancro e cellule immunitarie nel microambiente tumorale ha importanti implicazioni prognostiche e terapeutiche. Il ligando di morte cellulare programmata 1 (PD-L1) è una molecola cruciale nel percorso biologico del checkpoint immunitario (114). È stato anche dimostrato che il valore clinico del PD-L1 è sia un marker prognostico che un bersaglio per la terapia in un'ampia gamma di neoplasie umane, incluso il carcinoma della testa e del collo(115). Sulla base dei risultati di sopravvivenza dello studio KEYNOTE-048, nel 2019 l'Agenzia europea dei medicinali ha approvato pembrolizumab in monoterapia o in combinazione con platino +5-fluorouracile come trattamento di prima linea per i pazienti con carcinoma della testa e del collo ricorrente o metastatico, PD-L1 positivi con CPS ≥ 1 (91). Solo pochi studi hanno indagato il

ruolo di PD-L1 concentrandosi solo su pazienti con LSCC; il metodo CPS - già in uso per la valutazione del PD-L1 in altri tumori maligni - è stato adottato molto raramente per LSCC(113). Le relazioni biologiche del PD-L1 con i linfociti infiltranti il tumore (TILs) sono state recentemente esplorate nel LSCC (113).

Gli obiettivi di questa indagine esplorativa sono stati di analizzare: (i) la concordanza tra biopsie LSCC e rispettivi campioni chirurgici in termini di caratterizzazione di TSR, tipo di stroma, *large cell nests* e *budding* tumorale; (ii) l'associazione tra TSR, espressione di PD-L1 e altre caratteristiche clinico-patologiche; (iii) il ruolo prognostico e predittivo di TSR e PD-L1 in una casistica consecutiva di LSCC.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Pazienti

Lo studio è stato condotto in accordo con i principi della Dichiarazione di Helsinki. Tutti i pazienti hanno firmato un dettagliato consenso informato in merito al trattamento e alla pubblicazione dei loro dati. Hanno consentito “l’uso dei loro dati clinici per la ricerca nei campi medici, biomedici ed epidemiologici, anche in vista di essere richiamati in futuro per follow-up se necessario”. I dati sono stati analizzati rispettando le leggi italiane sulla privacy e sul trattamento dei dati sensibili, in accordo con i regolamenti interni all’Università di Padova.

Lo studio ha coinvolto 43 casi di carcinoma squamoso della laringe precoce e localmente avanzato, trattati in prima istanza con l’intervento chirurgico tra il 1999 e il 2013. Tutti i pazienti (39 maschi, 4 femmine; età media 65.0 ± 8.2 anni) sono stati sottoposti a intervento di microlaringoscopia con biopsia laringea, endoscopia del tratto aereo-digestivo superiore, ultrasonorografia del collo (con o senza citologia da agoaspirato), tomografia assiale computerizzata di testa e collo con contrasto (TC) e/o risonanza magnetica, radiografia del torace in bianco e ecografia epatica.

Tutti i pazienti sono andati incontro ad intervento di chirurgia laringea primaria presso la Clinica Otorinolaringoiatrica dell’Università di Padova, includendo uno svuotamento unilaterale o bilaterale dei linfonodi in 41 casi. I risultati patologici hanno giustificato la radioterapia adiuvante postoperatoria (con o senza chemioterapia concomitante) in 21 casi in conformità con le attuali linee guida. Non sono state riscontrate metastasi a distanza alla diagnosi. Sono state programmate visite di follow-up dopo il trattamento presso il nostro istituto (in accordo alle caratteristiche individuali dei pazienti): una volta al mese durante il primo anno post-intervento; ogni due mesi il secondo anno; ogni tre mesi il terzo; ogni quattro il quarto; ogni sei mesi il quinto; poi una volta l’anno. Se suggerito dai dati clinici, sono state ripetute la TC con mezzo di contrasto del collo, la tomografia ad emissione di positroni di tutto il corpo, la TC del torace e l’ultrasonorografia del collo e del fegato. La media di durata del follow-up è stata di 76.2 ± 46.5 mesi (mediana 80 mesi).

4.2 Indagini istopatologiche

Per ciascun paziente incluso nello studio, il parametro *Tumor-stroma ratio* è stato valutato sui vetrini colorati con ematossilina-eosina (HE) sia delle biopsie preoperatorie che dei corrispondenti campioni operatori, provenienti dall'archivio del Dipartimento di Anatomia Patologica. I campioni sono stati analizzati da due patologhe esperte in patologia oncologica del distretto testa-collo, che insieme hanno selezionato tutti i vetrini più rappresentativi. Questi sono stati inizialmente valutati al microscopio ottico ad un ingrandimento complessivo di 40x e osservati con ingrandimento 4x, per identificare le aree che comprendessero la maggiore quantità di stroma. Nei vetrini relativi ai campioni operatori, è stato anche incluso il fronte di invasione della neoplasia. Successivamente i vetrini più rappresentativi sono stati osservati ad un ingrandimento di 100x; sono stati esclusi tutti i campi in cui non fossero presenti sia il tumore che lo stroma, e in cui non fossero visualizzabili cellule tumorali su tutti i lati del campo analizzato.

Non sono state considerate parte dello stroma tutte le aree con presenza di necrosi, così come le strutture vascolari più grandi e le aree comprendenti tessuto muscolare. Non sono state escluse dal compartimento stromale le strutture vascolari più piccole, i nervi, le aree con infiltrato linfocitario. I campioni tissutali sono stati classificati come poveri di stroma/*TSR high* (con una porzione di stroma inferiore al 50%), o ricco di stroma/*TSR low* (in cui lo stroma è superiore al 50%), come riportato da van Pelt et al (67). Le aree di necrosi sono state escluse dalla valutazione dello stroma, come anche le strutture vascolari maggiori e il tessuto muscolare; al contrario i nervi, i piccoli vasi e l'infiltrato linfocitario non sono stati esclusi dal compartimento stromale. Lo stroma, indipendentemente dalla sua quantità, è stato classificato come fibroblastico quando caratterizzato da tessuto connettivo lasso o come fibrotico quando era presente uno stroma denso, omogeneo e ricco di collagene.

Il *budding* tumorale è stato definito come cellule singole o gruppi di cellule (fino a quattro), presenti sul margine invasivo del cancro. Tale fenomeno è stato suddiviso in *peri-tumoral budding* (PTB, con *budding* tumorale nel fronte invasivo del tumore), valutata su vetrini dei campioni chirurgici, e *intra-tumoral budding* (ITB, con *budding* tumorale nel nucleo della neoplasia), valutata su vetrini di biopsie preoperatorie. Per valutare l'attività di *budding*, 10 campi del fronte

invasivo sono stati esaminati a medio ingrandimento per identificare l'hotspot. Il conteggio dei *budding* in ciascun hotspot è stato quindi diviso per il fattore di normalizzazione più appropriato (1.563), in base al numero di campo oculare del microscopio utilizzato (25 mm), per garantire il conteggio TB per 0.785 mm², come raccomandato dall'ITBCC (116). Ai fini della stratificazione del rischio, è stato applicato un sistema a due livelli per classificare il *budding* tumorale, utilizzando un cut-off di cinque per discriminare tra casi a rischio basso (LR; meno di 5 *buds* e alto (HR; 5 o più *buds*), come frequentemente utilizzato nel carcinoma della testa e del collo(117) . È stata inoltre registrata la presenza/assenza di *large cell nests* di cellule neoplastiche (definiti come nidi contenenti >15 cellule neoplastiche).

Il modello di crescita del tumore è stato riportato come *expansile* (con bordi spinti e ben circoscritti e/o bordi offuscati dall'invasione di *large tumor nests*) o *infiltrantive* (con *diffuse small nests*, grappoli irregolari o cordoni di cellule tumorali che si diffondono senza confini distinti).

I linfociti infiltranti il tumore (TILs) sono stati valutati come percentuale dello stroma peritumorale/intratumorale totale occupato da cellule infiammatorie mononucleate (linfociti e plasmacellule). Queste ultime due caratteristiche istologiche sono state valutate solo su vetrini da campioni chirurgici.

4.3 Immunoistochimica

L'immunoistochimica (IHC) è stata eseguita utilizzando il kit *Bond Polymer Refine Detection* (Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, Regno Unito) nel sistema *BOND-MAX* (Leica Biosystems) con l'anticorpo specifico per PD-L1 (22C3, IHC PharmDx, Dako, Carpinteria, Ca, USA; diluizione 1:50), come riportato in precedenza [14-16]. In dettaglio, erano necessarie almeno 100 cellule tumorali vitali per un'adeguata valutazione di PD-L1, che è stato studiato utilizzando il *combined positive score* (CPS). Il CPS indica il numero di cellule marcate con PD-L1 (cellule tumorali, macrofagi e linfociti) diviso per il numero totale di cellule tumorali, moltiplicato per 100 (118). Qualsiasi cellula tumorale vitale con colorazione della membrana lineare parziale o completa percepita come distinta dalla colorazione citoplasmatica è stata considerata positiva ai fini del punteggio PD-L1. Ogni cellula infiammatoria mononucleata con evidente colorazione di membrana e/o citoplasmatica all'interno dei *nests* tumorali e/o dello stroma di supporto adiacente è stata considerata PD-L1-positiva e inclusa nello score. I casi sono stati considerati PD-L1-positivi se lo score (CPS) era uguale o superiore a 1.

4.4 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite con *SAS 9.4 for Windows* (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). I dati sono presentati come medie e deviazioni standard, mediane e intervalli interquartile per variabili quantitative; come conteggi e percentuali per le variabili categoriali.

La concordanza nel punteggio TSR tra biopsia e campioni chirurgici è stata valutata con la *Gwet's AC1 statistic* che esprime la probabilità condizionata che due valutatori selezionati casualmente siano d'accordo dato che non c'è accordo per caso. Tale analisi regola la probabilità di accordo globale per l'accordo casuale. La *Gwet's AC1 statistic* ha la stessa interpretazione della statistica kappa nel seguente intervallo: <0.20, scarsa concordanza; 0.21-0.40, discreta concordanza; 0.41-0.60, moderata concordanza; 0.61-0.80, buona concordanza; 0.81 - 1.00, ottima concordanza.

L'associazione della TSR, valutata su biopsia e campioni chirurgici, con le caratteristiche istopatologiche è stata valutata con il test di *Mann-Whitney* in caso di caratteristiche quantitative, con il *Fisher's exact test* per quelle categoriali.

Il ruolo prognostico di ogni aspetto clinico-patologico e istopatologico verso l'assenza di recidiva è stato analizzato con l'*univariate Cox regression*. L'intervallo libero da malattia è stato calcolato come il tempo trascorso dall'intervento chirurgico alla recidiva di LSCC o all'ultimo follow-up per i pazienti censurati.

L'ipotesi di proporzionalità dei modelli di Cox è stata verificata con il *Kolmogorov-type supremum test* utilizzando 1.000 ricampionamenti. I risultati sono stati espressi come *p-value* e rapporto di rischio (*HR*) con intervallo di confidenza (*CI*) del 95%. Non è stato possibile eseguire una *multivariate Cox regression*, poiché le variabili risultate statisticamente significative ($p < 0.05$) all'univariata, erano collineari.

Un *p-value* < 0.05 è stato considerato indicativo di significatività statistica.

5 RISULTATI

5.1 Outcome generale

Quattordici dei 43 pazienti consecutivi con LSCC considerati in questa casistica (32.6%) hanno manifestato recidiva della malattia dopo un follow-up medio di 11.9 mesi (mediana 11 mesi). Ventinove (67.4%) non hanno mostrato evidenza di malattia dopo una media di 84.7 mesi (mediana 84 mesi).

5.2 Concordanza tra biopsie e relativi campioni operatori in relazione al parametro TSR ed alle altre variabili patologiche

La tabella I mostra la concordanza tra biopsie e relativi campioni chirurgici in termini di caratterizzazione di TSR, tipo di stroma, *large cell nests* e *budding* tumorale. Secondo la scala di riferimento di Altman(119) è stato trovato un buon accordo tra biopsie e campioni chirurgici sia per il TSR (Figura 6C-6F) che per il parametro *large cell nests* (Figura 6E, 6F) (statistica AC1 0.7957 e 0.6935) e un ottimo accordo sia per il tipo di stroma (Figura 6A-6F) che per il *budding* tumorale (Figura 6A, 6B) (statistica AC1 0.8829 e 0.8244).

Tab. I concordanza tra variabili patologiche misurata su biopsie e materiali operatori.

Variabili sui materiali operatori				
	TSR	TSR high/ Poveri di stroma (N = 29)	TSR low/ Ricchi di stroma (N = 14)	Statistica AC1 (95% CI)
TSR sulle biopsie	<i>TSR high</i> /Poveri di stroma	27 (93.1)	03 (21.4)	0.7957 (0.6187 - 0.9727)
	<i>TSR low</i> /Ricchi di stroma	02 (06.9)	11 (78.6)	
	Tipo di stroma	Fibroblastico (N = 5)	Fibrotico (N = 38)	Statistica AC1 (95% CI)
Tipo di stroma sulle biopsie	Fibroblastico	03 (60.0)	02 (5.3)	0.8829 (0.7641 - 1.0000)
	Fibrotico	02 (40.0)	36 (94.7)	
	Large cell nests	Assenti (N = 8)	Presenti (N = 35)	Statistica AC1 (95% CI)
Large cell nests sulle biopsie	Assenti	04 (50.0)	05 (14.3)	0.6935 (0.4849 - 0.9020)
	Presenti	04 (50.0)	30 (85.7)	
	Budding tumorale	Basso rischio (N = 37)	Alto rischio (N = 6)	Statistica AC1 (95% CI)
Budding tumorale sulle biopsie	Basso rischio	35 (94.6)	04 (66.7)	0.8244 (0.6768 - 0.9719)
	Alto rischio	02 (05.4)	02 (33.3)	

Interpretazione del Gwet's AC1 statistic: <0.20, poca concordanza; da 0.21 a 0.40, discreta concordanza; da 0.41 a 0.60, moderata concordanza; da 0.61 a 0.80, buona concordanza; da 0.81 a 1.00, ottima concordanza.

TSR: tumor-to-stroma ratio; 95% CI: 95% intervallo di confidenza.

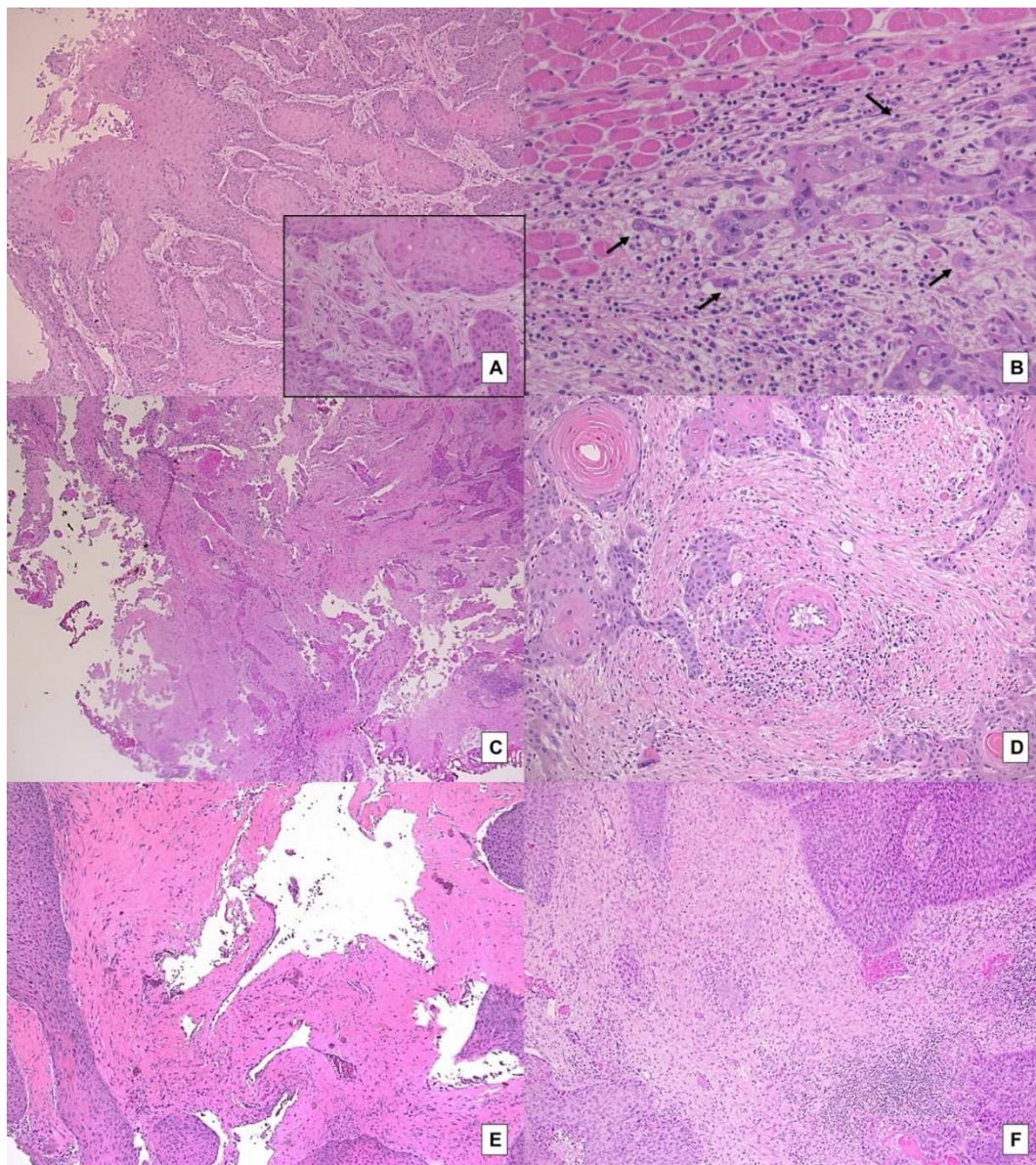


Figura 6. Biopsie e relativi campioni chirurgici: (A) biopsia LSCC con un TSR elevato (caso povero di stroma), che mostra gemme tumorali in uno stroma fibroblastico (H&E, ingrandimento originale 50x; riquadro: ingrandimento originale 200x); (B) campione chirurgico dello stesso caso di A, in cui i buds tumorali sono evidenti nella parte anteriore dell'invasione del tumore (freccie) in uno stroma fibroblastico; la muscolatura liscia può essere vista nella parte superiore dell'immagine (H&E, ingrandimento originale 200x); (C) biopsia di un TSR low (caso stroma alto) (H&E, ingrandimento originale 25x); (D) campione chirurgico corrispondente (H&E, ingrandimento originale 100x); (E) biopsia di TSR low (caso ricco di stroma), large cell nests e stroma fibrotico (H&E, ingrandimento originale 50x); (F) rispettivo campione chirurgico (H&E, ingrandimento originale 50x).

Tab. II Associazione tra variabili clinicopatologiche e TSR sulle biopsie e sui materiali operatori.

	TSR (biopsia)		<i>P</i> <i>Value*</i>	TSR (materiale operatorio)		<i>P</i> <i>Value*</i>
	<i>TSR high</i> / Povero di stroma (N = 30)	<i>TSR low</i> / Ricco di stroma (N = 13)		<i>TSR high</i> / Povero di stroma (N = 29)	<i>TSR low</i> / Ricco di stroma (N = 14)	
Tipo di stroma (biopsia)						
Fibroblastico	03 (10.0)	02 (15.4)	0.6299			
Fibrotico	27 (90.0)	11 (84.6)				
Large cell nests (biopsia)						
Assenti	06 (20.0)	03 (23.1)	1.0000			
Presenti	24 (80.0)	10 (76.9)				
Conta dei <i>intra-tumoral budding</i> (biopsia)						
Media (SD)	1.47 (2.92)	0.85 (1.46)				
Mediana (IQR)	0.00 (0.00 – 1.00)	0.00 (0.00 – 1.00)	0.8217			
Budding tumorale (biopsia)						
Basso rischio	27 (90.0)	12 (92.3)	1.0000			
Alto rischio	03 (10.0)	01 (07.7)				
Tipo di stroma (materiale operatorio)						
Fibroblastico	03 (10.0)	02 (15.4)	0.6299	02 (6.9)	03 (21.4)	0.3091
Fibrotico	27 (90.0)	11 (84.6)		27 (93.1)	11 (78.6)	
Large cell nests (materiale operatorio)						
Assenti	05 (16.7)	03 (23.1)	0.6806	04 (13.8)	04 (28.6)	0.4038
Presenti	25 (83.3)	10 (76.9)		25 (86.2)	10 (71.4)	
Conta dei <i>peri-tumoral budding</i> (materiale operatorio)						
Media (SD)	1.53 (2.29)	3.46 (5.32)	0.3892	1.14 (1.64)	4.14 (5.29)	

	TSR (biopsia)			TSR (materiale operatorio)		
	<i>TSR high/Povero di stroma</i> (N = 30)	<i>TSR low/Ricco di stroma</i> (N = 13)	<i>P Value*</i>	<i>TSR high /Povero di stroma</i> (N = 29)	<i>TSR low/Ricco di stroma</i> (N = 14)	<i>P Value*</i>
Mediana (IQR)	0.50 (0.00 – 3.00)	1.00 (0.00 – 4.00)		0.00 (0.00 – 2.00)	3.00 (0.00 – 6.00)	0.0464
<i>Budding tumorale (materiale operatorio)</i>						
Basso rischio	27 (90.0)	10 (76.9)	0.3455	27 (93.1)	10 (71.4)	0.0767
Alto rischio	03 (10.0)	03 (23.1)		02 (06.9)	04 (28.6)	
<i>CPS (materiale operatorio)</i>						
<1	15 (50.0)	12 (92.3)	0.0143	14 (48.3)	13 (92.9)	
≥1	15 (50.0)	01 (07.7)		15 (51.7)	01 (07.1)	0.0063
<i>TILs (materiale operatorio)</i>						
Media (SD)	35.67 (21.12)	28.08 (20.87)		37.41 (21.45)	25.00 (18.29)	
Mediana (IQR)	30.00 (15.00 – 50.00)	20.00 (15.00 – 30.00)	0.2470	35.00 (20.00 – 50.00)	20.00 (15.00 – 30.00)	0.0660
<i>Pattern di invasione (materiale operatorio)</i>						
<i>Expansile</i>	23 (76.7)	07 (53.8)	0.1630	23 (79.3)	07 (50.0)	0.0774
<i>Infiltrantive</i>	07 (23.3)	06 (46.2)		06 (20.7)	07 (50.0)	

* Fisher's exact test per le variabili categoriche; Mann-Whitney test per le variabili quantitative

TSR: tumor-to-stroma ratio; CPS: PD-L1 continuous positive score; TILs: tumor infiltrating lymphocytes; SD: standard deviation; IQR: inter-quartile range

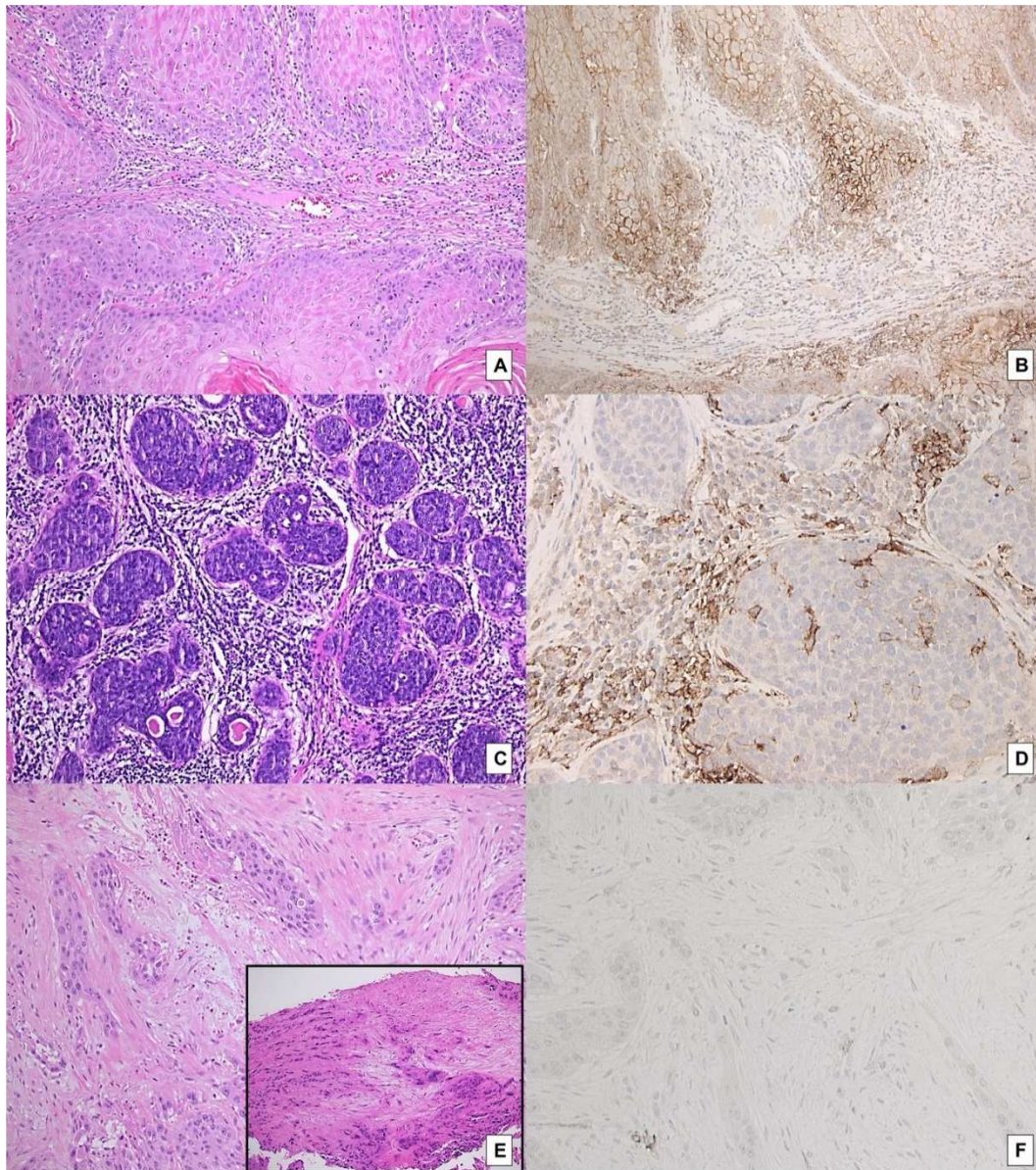


Figura 7. Associazione tra TSR e altre variabili clinico-patologiche sia su biopsie che su rispettivi campioni chirurgici: (A) campione chirurgico con un TSR high (caso povero di stroma) (H&E, ingrandimento originale 100x); (B) stesso caso, che mostra un'elevata espressione di PD-L1 (CPS>1), principalmente da parte di cellule neoplastiche (immunocolazione per PD-L1, ingrandimento originale 100x); (C) un altro caso di TSR high associato ad alta densità di TIL stromali (H&E, ingrandimento originale 100x); (D) stesso caso, che mostra un'elevata espressione di PD-L1 (CPS>1), principalmente da parte di cellule peritumorali infiammatorie mononucleate (immunocolazione per PD-L1, ingrandimento originale 200x); (E) un caso ricco di stroma (TSR low) sia sulla biopsia (riquadro) che sul campione chirurgico associato (H&E, ingrandimento originale 100x); (F) stesso caso, che mostra un'espressione PD-L1 quasi assente (CPS <1) (immunocolazione per PD-L1, ingrandimento originale 200x).

5.3 Associazione tra TSR e altre variabili clinico-patologiche sia sulle biopsie che nei rispettivi campioni chirurgici

La tabella II riporta l'analisi dell'associazione tra TSR e le variabili clinico-patologiche considerate su biopsie e relativi campioni chirurgici. È stato riscontrato che un CPS <1 valutato su campioni chirurgici è significativamente associato a un *TSR low* (ricco di stroma) sia sulle biopsie che sui campioni chirurgici ($p = 0.0143$ e $p = 0.0063$) (Figura 7A-F). Sono state rivelate le tendenze statistiche verso un'associazione tra TSR nei campioni chirurgici e TILs ($p = 0.0660$) (Figura 7 C, D), *pattern* di invasione ($p = 0.0774$) e *budding* tumorale su campioni chirurgici ($p = 0.0767$). Inoltre, il TSR e la conta dei *peri-tumoral buds*, entrambe determinate su campioni chirurgici, erano mutuamente associati ($p=0.0464$) (Figura 7E).

5.4 Valore prognostico del TSR e delle variabili clinico-patologiche

La tabella III riassume i risultati dell'*univariate Cox's regression model for DFS prediction*, sulla base delle variabili considerate in questo studio. È stata considerata l'ottava edizione della classificazione TNM dei tumori maligni(21). Anche un *TSR low* (ricco di stroma) ha mostrato un valore prognostico negativo significativo, quando valutato sia su biopsie che su campioni chirurgici (HR=8.808 IC 95%: 2.739-28.323, p=0.0003 e HR=11.207 IC 95%: 3.093-40.611, p=0.0002). D'altra parte, un CPS \geq 1 sembrava essere un fattore prognostico favorevole (HR=0.100 IC 95%: 0.013-0.764, p=0.0265).

Tab. III Valore prognostico delle variabili clinico-patologiche (univariate Cox's regression model).

N = 43	Outcome		P Value	HR (95% CI)
	Assenza di recidiva (N = 29)	Recidiva di malattia (N = 14)		
Età				
Media (SD)	63.48 (8.69)	68.29 (6.29)		
Mediana (IQR)	64.00 (60.00 – 68.00)	68.00 (64.00– 72.00)	0.0772	1.061 (0.994 - 1.134)
Classificazione pT				
T1+T2	15 (51.7)	04 (28.6)		1
T1	06 (20.7)	01 (07.1)		
T2	09 (31.0)	03 (21.4)		
T3+T4	14 (48.3)	10 (71.4)	0.1869	2.185 (0.684 - 6.977)
T3	08 (27.6)	09 (64.3)		
T4	06 (20.7)	01 (07.1)		
Grading				
G1	05 (17.2)	02 (14.3)		1

N = 43	<i>Outcome</i>		<i>P Value</i>	HR (95% CI)
	Assenza di recidiva (N = 29)	Recidiva di malattia (N = 14)		
G2+G3	24 (82.8)	12 (85.7)	0.7986	1.215 (0.272 - 5.440)
G2	16 (55.2)	04 (28.6)		
G3	08 (27.6)	08 (57.1)		
<i>N-status</i>				
N0	24 (82.8)	08 (57.1)		1
N+	05 (17.2)	06 (42.9)	0.0736	2.642 (0.911 - 7.657)
Stadio				
I+II	13 (44.8)	04 (28.6)		1
I	06 (20.7)	01 (07.1)		
II	07 (24.1)	03 (21.4)		
III+IV	16 (55.2)	10 (71.4)	0.3525	1.734 (0.543 - 5.533)
III	08 (27.6)	04 (28.6)		
IV	08 (27.6)	06 (42.9)		
TSR (biopsia)				
TSR high/Poveri di stroma	26 (89.7)	04 (28.6)		1
TSR low/Ricchi di stroma	03 (10.3)	10 (71.4)	0.0003	8.808 (2.739 - 28.323)
Tipo di stroma (biopsia)				
Fibroblastico	03 (10.3)	02 (14.3)		1
Fibrotico	26 (89.7)	12 (85.7)	0.7941	0.819 (0.183 - 3.662)
Large cell nests (biopsia)				
Assenti	07 (24.1)	02 (14.3)		1

N = 43	<i>Outcome</i>			
	Assenza di recidiva (N = 29)	Recidiva di malattia (N = 14)	<i>P Value</i>	HR (95% CI)
Presenti	22 (75.9)	12 (85.7)	0.3873	1.937 (0.433 - 8.671)
Conta dei <i>intra-tumoral budding</i> (biopsia)				
Media (SD)	1.45 (2.97)	0.93 (1.44)		
Mediana (IQR)	0.00 (0.00 – 1.00)	0.00 (0.00 – 2.00)	0.4730	0.904 (0.687 - 1.190)
<i>Budding</i> tumorale (biopsia)				
Basso rischio	26 (89.7)	13 (92.9)		1
Alto rischio	03 (10.3)	01 (07.1)	0.6632	0.636 (0.083 - 4.868)
TSR (materiale operatorio)				
<i>TSR high/poveri di stroma</i>	26 (89.7)	03 (21.4)		1
<i>TSR low/Ricchi di stroma</i>	03 (10.3)	11 (78.6)	0.0002	11.207 (3.093 - 40.611)
Tipo di stroma (materiale operatorio)				
Fibroblastico	04 (13.8)	01 (07.1)		1
Fibrotico	25 (86.2)	13 (92.9)	0.4897	2.049 (0.268 - 15.675)
<i>Large cell nest</i> (materiale operatorio)				
Assenti	05 (17.2)	03 (21.4)		
Presenti	24 (82.8)	11 (78.6)	0.9029	0.924 (0.257 - 3.317)
Conta dei <i>peri-tumoral budding</i> (materiale operatorio)				
Media (SD)	1.41 (2.34)	3.57 (5.02)		
Mediana (IQR)	0.00 (0.00 – 2.00)	2.00 (0.00 – 4.00)	0.0992	1.095 (0.983 - 1.219)
<i>Budding</i> tumorale (materiale operatorio)				

Outcome				
N = 43	Assenza di recidiva (N = 29)	Recidiva di malattia (N = 14)	P Value	HR (95% CI)
Basso rischio	26 (89.7)	11 (78.6)		1
Alto rischio	03 (10.3)	03 (21.4)	0.5232	1.516 (0.423 - 5.438)
CPS (materiale operatorio)				
<1	14 (48.3)	13 (92.9)		1
≥1	15 (51.7)	01 (07.1)	0.0265	0.100 (0.013 - 0.764)
TILs % (materiale operatorio)				
Media (SD)	37.24 (21.28)	25.36 (18.96)		
Mediana (IQR)	30.00 (20.00 – 50.00)	20.00 (10.00 – 30.00)	0.0795	0.972 (0.942 - 1.003)
Pattern di invasione (materiale operatorio)				
<i>Expansile</i>	23 (79.3)	07 (50.0)		1
<i>Infiltrative</i>	06 (20.7)	07 (50.0)	0.1074	2.368 (0.829 - 6.766)

6 DISCUSSIONE

6.1 Significato della TSR come marker di aggressività biologica negli LSCC

Solo pochi studi precedenti (52,59,111) hanno studiato il ruolo del TSR nei pazienti con LSCC. Inoltre, alcuni studi (52,111) non hanno considerato solo il LSCC, ma hanno raggruppato diverse sedi tumorali (faringe) e incluso biopsie preoperatorie solo nei casi trattati con chemioterapia neoadiuvante, come surrogato di campioni chirurgici(111). In questo studio, il TSR è stato valutato per la prima volta sia su biopsie preoperatorie che su rispettivi campioni chirurgici di LSCC, mostrando una buona concordanza tra le due fonti di tessuto neoplastico (statistica AC1 0.79) e un alto valore prognostico predittivo in termini di recidiva. Un confronto simile è stato eseguito in precedenza solo da uno studio sul carcinoma esofageo, in cui il punteggio TSR sulle biopsie era concordante con i campioni chirurgici nell'81% dei casi(120).

Considerando i campioni chirurgici, è stata trovata un'associazione tra un basso TSR (tumori ricchi di stroma) e un elevato *budding* tumorale. Ciò è coerente con studi recenti sul cancro del colon (121,122) e LSCC (52) e riflette la visione recentemente accettata secondo cui entrambe le variabili sono marcatori di transizione epiteliale-mesenchimale (EMT). Come è noto, l'EMT è fondamentale per la cancerogenesi e mostra implicazioni prognostiche anche nei LSCC (122). Un fenotipo mesenchimale (stromale) è stato associato a un fronte invasivo del tumore in cui le cellule tumorali (*tumor budding*) si interfacciano con le cellule stromali(123). Di conseguenza, da un punto di vista patologico, un'elevata attività di *budding* tumorale è stata significativamente associata a tumori ricchi di stroma nel cancro della testa e del collo(52,59) ed è stato ipotizzato che quantità maggiori di stroma potrebbero facilitare l'EMT. Considerando il ruolo dell'infiltrato infiammatorio, lo stroma sembra promuovere la tumorigenesi prevenendo l'infiltrazione delle cellule immunitarie nel tumore. I miofibroblasti/fibroblasti stromali creano una barriera fisica contro le cellule immunitarie grazie alle loro proprietà contrattili, favorendo così la progressione del tumore(124). Questo peculiare meccanismo sembra emergere anche dal nostro studio: i casi ricchi di

stroma, valutati in campioni chirurgici, presentavano una percentuale inferiore di TILs stromali (anche se non statisticamente significativa $p=0.0660$), suggerendo come il microambiente tumorale possa determinare una maggiore difficoltà per le cellule immunitarie di raggiungere il nucleo del tumore. Questo particolare comportamento tra TSR e TIL, come già dimostrato in diversi istotipi tumorali(125,126), sembra essere uno dei possibili meccanismi di fuga dal sistema immunitario che le cellule tumorali stabiliscono durante l'EMT per eludere l'immunosorveglianza. Questi risultati sono in linea con le precedenti osservazioni secondo cui un'elevata percentuale di stroma è associata a un infiltrato infiammatorio peritumorale più debole in pazienti con altre neoplasie solide (125). È interessante notare che il punteggio di previsione della disfunzione immunitaria e dell'esclusione tumorale (TIDE) (98), un surrogato dell'aumento del potenziale di evasione immunitaria, è risultato essere più alto nei casi con stroma alto rispetto a quelli con stroma basso(127).

Da un punto di vista biologico, il TSR sembra essere l'epifenomeno istologico del concetto genomico di *Stromal-Epithelial Signature Ratio* (SESR), che dipende dall'espressione differenziale di pattern di geni specifici per i fibroblasti (C3, CFP, ECM1, THBS1 e TIMP1) e cellule epiteliali maligne (C4BPA, CFB, CHGA, PF4, PPBP, SAA2, SERPINA1 e SERPIND1) (127). In linea con questa visione, i punteggi di arricchimento per la firma stromale sono risultati più alti nei tumori con stroma alto, rispetto ai tumori con stroma basso, probabilmente riflettendo il processo biologico di EMT (128).

6.2 PD-L1 e TSR

La relazione tra tumore e microambiente immunitario si riflette anche nell'espressione di PD-L1, che è una molecola cruciale nella regolazione della risposta immunitaria. La sua espressione sia nelle cellule tumorali che nelle cellule immunitarie nel microambiente tumorale è stata studiata come marker prognostico e predittivo in un'ampia gamma di neoplasie umane (118,129). È interessante notare che nella nostra casistica, PD-L1 era significativamente più alto nei tumori con *TRS high*/poveri di stroma sia nelle biopsie preoperatorie che nei campioni chirurgici. Questo pattern di associazione tra TSR ed espressione di PD-L1 sembra essere coerente con quanto già descritto in altri tipi di tumore, inclusi il cancro del colon-retto e il cordoma spinale (130,131). Questa associazione potrebbe essere spiegata come segue: la secrezione di PD-1 da parte delle cellule stromali mesenchimali (che sono altamente rappresentate nei casi di neoplasie con *TRS low*/ricchi di stroma) può sopprimere la proliferazione delle cellule T, portando a una riduzione della loro concentrazione, che si traduce anche in una down-regolazione dell'espressione di PD-L1 anche sulla superficie dei linfociti T (132). Secondo l'evidenza attuale, l'inclusione dell'espressione di PD-L1 sulle cellule immunitarie infiltranti il tumore e non solo sulle cellule tumorali aumenta il valore predittivo. In effetti, il CPS offre una valutazione del tumore più efficace rispetto al punteggio della proporzione del tumore, che misura l'espressione di PD-L1 sulle sole cellule tumorali (133). Da un punto di vista clinico, un CPS più elevato è stato considerato un marcatore predittivo rilevante per la terapia mirata, essendo associato a una risposta potenziata agli inibitori del PD-L1 (91,114). Di conseguenza, il TSR, oltre ad essere un fattore prognostico correlato al rischio di recidiva, sembra anche avere un ruolo potenziale come predittore della risposta agli inibitori multi-chinasi nel cancro del colon(134). Ciò può essere coerente con le vie biologiche coinvolte nella relazione tumore-stroma, con conseguente attivazione a valle di chinasi multiple, stimulate dall'interazione tra il ligando secreto dallo stroma HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) e l'onco-recettore MET (*Hepatocyte Growth Factor Receptor*) (135).

Nonostante la natura preliminare dei nostri risultati, la buona concordanza tra biopsie e campioni chirurgici abbinati nella valutazione del TSR può aprire la strada all'impiego di questo marcatore sia in una valutazione del rischio

preoperatorio che come fattore predittivo di risposta a un eventuale terapia adiuvante. Inoltre, se confermata da ulteriori dati su scala più ampia, la possibilità di ottenere una caratterizzazione affidabile del TSR da biopsie potrebbe consentire di utilizzare quest'ultima come marker biologico predittivo anche in contesti non chirurgici, come nei casi avanzati non resecabili, in modo simile all'attuale analisi di PD-L1 su biopsie in tumori avanzati della testa e del collo potenzialmente adatti per i *checkpoint inhibitors* (91,114). Sono necessari futuri studi prospettici prima di concludere che TSR e CPS, valutati nelle biopsie pre-trattamento, possano identificare i pazienti a più alto rischio di recidiva della malattia, che potrebbero beneficiare di un'intensificazione del trattamento oncologico (chemioterapia neoadiuvante, radioterapia postoperatoria o terapia combinata) o almeno un più attento follow up clinico e radiologico.

Questo studio è stato il primo ad analizzare il ruolo integrato di TSR e PD-L1 in un contesto biotico preoperatorio e istopatologico finale di LSCC. I principali punti di forza di questa indagine risiedono nell'omogeneità della serie di pazienti considerati come: (I) è stato preso in considerazione un unico istotipo specifico (SCC) localizzato in un'unica struttura della testa e del collo (la laringe); (II) tutti i pazienti sono stati sottoposti a chirurgia laringea primaria, eseguita consecutivamente dalla stessa equipe nello stesso istituto; (III) sono stati valutati sia i campioni chirurgici preoperatori che quelli accoppiati di LSCC; (IV) sono state valutate diverse variabili patologiche non convenzionali (TSR, tipo di stroma, *large cell nest*, *budding* tumorale e TILs); (V) l'anticorpo PD-L1 utilizzato (22C3 IHC PharmDX) era un clone commerciale che era stato validato da un panel di esperti a fini terapeutici, così come il sistema di punteggio adottato (CPS); (VI) I criteri clinico-radiologici di follow-up oncologico sono stati standardizzati. Le principali debolezze dello studio riguardano la natura retrospettiva dell'indagine, e il numero limitato di casi considerati, anche a causa del basso numero di casi con biopsia preoperatoria disponibile.

7 CONCLUSIONI

L'identificazione di nuovi parametri prognostici è fondamentale per una migliore stratificazione prognostica dei LSCC avanzati, portando eventualmente allo sviluppo di strategie terapeutiche su misura. La presente indagine esplorativa ha rilevato che il TSR valutato nelle biopsie laringee pretrattamento e nell'intero tumore asportato possedeva un valido significato prognostico. Il TSR è un parametro di rapida e facile applicazione che può essere introdotto nella pratica diagnostica laringologica di routine, se validato in una casistica più ampia. Ulteriori indagini sulla significativa associazione nella valutazione del TSR e dell'espressione di PD-L1 tra i campioni biopsici e chirurgici potrebbero anche portare a nuove conoscenze sulla biologia del LSCC con un potenziale impatto sui trattamenti mirati, anche per quanto riguarda l'efficacia dei protocolli immunoterapici basati su PD-1 o sui *checkpoint inhibitors* di PD-L1.

8 BIBLIOGRAFIA

1. Anastasi Giuseppe, Capitani Silvano CML et al. Trattato di anatomia umana. volume 2:253–5.
2. Noordzij JP, Ossoff RH. Anatomy and Physiology of the Larynx. *Otolaryngol Clin N Am.* 2006;39:1–10.
3. Anastasi Giuseppe, Capitani Silvano CML et al EE. Trattato di anatomia umana. volume 2:251.
4. AIOM. Linee Guida Tumori della Testa e del Collo. 2018;9-41;67-71.
5. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019;144(8):1941–53.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016 Jan;66(1):7–30.
7. Marioni G, Marchese-Ragona R, Cartei G, Marchese F, Staffieri A. Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2006;32:504–15.
8. Licitra L, Bernier J, Grandi C, Locati L, Merlano M, Gatta G, et al. Cancer of the larynx. Vol. 47, *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* Elsevier Ireland Ltd; 2003. p. 65–80.
9. Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM. Cancer incidence and mortality in the European union: Cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer Part A.* 1997 Jun;33(7):1075–107.
10. Almadori G, Bussu F, Cadoni G, Galli J, Paludetti G, Maurizi M. Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: Towards an integrated clinicobiological approach. *Eur J Cancer.* 2005;41(5):683–93.
11. K. S. Histological typing of tumors of the upper respiratory tract and ear. *Int Histol Classif tumors.* 1991;
12. Kumar V., Abbas A.K. *AJC et all. Le basi patologiche delle malattie,* volume II. 9th ed. edra; 2019. 717 p.
13. Starmer HM, Tippett DC, Webster KT. Effects of Laryngeal Cancer on Voice and Swallowing. *Otolaryngol Clin N Am.* 2008;41:793–818.
14. Taylan M, Can OF, Cetincakmak MG, Ozbay M. Effect of airway dynamics on the development of larynx cancer. *Laryngoscope.* 2016 May 1;126(5):1136–42.
15. Jones TM, De M, Foran B, Harrington K, Mortimore S. Laryngeal cancer: United Kingdom National Multidisciplinary guidelines. *J Laryngol Otol.* 2016 May 1;130(S2):S75–82.
16. Ho CM, Lam KH, Wei WI, Lau SK, Lam LK. Occult lymph node metastasis in small oral tongue cancers. *Head Neck.* 1992 Sep 1;14(5):359–63.

17. Cosway B, Drinnan M, Paleri V. Narrow band imaging for the diagnosis of head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review. Eisele DW, editor. *Head Neck*. 2016 Apr 1;38(S1):E2358–67.
18. Knappe M, Louw M, Gregor RT. Ultrasonography-guided fine-needle aspiration for the assessment of cervical metastases. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2000 Sep 1;126(9):1091–6.
19. de Bree R, Deurloo EE, Snow GB, Leemans CR. Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope*. 2000;110(3):397–401.
20. Seng CO, Schöder H, Lee NY, Patel SG, Carlson D, Fury M, et al. Clinical utility of 18F-FDG PET/CT in assessing the neck after concurrent chemoradiotherapy for locoregional advanced head and neck cancer. *J Nucl Med*. 2008 Apr 1;49(4):532–40.
21. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershewald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar 1;67(2):93–9.
22. Pradier R, González A, Matos E, Loria D, Adan R, Saco P, et al. Prognostic factors in laryngeal carcinoma experience in 296 male patients. *Cancer*. 1993;71(8):2472–6.
23. Succo G, Peretti G, Piazza C, Remacle M, Eckel HE, Chevalier D, et al. Open partial horizontal laryngectomies: A proposal for classification by the working committee on nomenclature of the European Laryngological Society. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2014 Apr 2;271(9):2489–96.
24. Vergez S, Sarini J, Vairel B, Espinasse G, Woisard V, De Bonnecaze G, et al. Laringectomie parziale sopracricoidee (cricoidopessia e crico-ioido-epiglottopessia). *EMC - Tec Chir - Chir ORL e Cerv-facc*. 2021 Aug 1;25(1):1–13.
25. Barry CP, Ahmed F, Rogers SN, Lowe D, Bekiroglu F, Brown JS, et al. Influence of surgical margins on local recurrence in T1/T2 oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2015 Aug 1;37(8):1176–80.
26. Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, Van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A, et al. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: A comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (#9501). *Head Neck*. 2005 Oct;27(10):843–50.
27. Pujo K, Philouze P, Scalabre A, Céruse P, Poupart M, Buiuret G. Salvage surgery for recurrence of laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma: A retrospective study from 2005 to 2013. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2018 Apr 1;135(2):111–7.
28. Budach W, Bölke E, Kammers K, Gerber PA, Orth K, Gripp S, et al. Induction chemotherapy followed by concurrent radio-chemotherapy versus concurrent radio-chemotherapy alone as treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC): A

- meta-analysis of randomized trials. In: *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd; 2016. p. 238–43.
29. Lamont EB, Vokes EE. Chemotherapy in the management of squamous-cell carcinoma of the head and neck. Vol. 2, *THE LANCET Oncology*. 2001.
 30. Ferlito A, Robbins KT, Shah JP, Medina JE, Silver CE, Al-Tamimi S, et al. Proposal for a rational classification of neck dissections. *Head Neck* [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2022 Jun 28];33(3):n/a-n/a. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hed.21614>
 31. Spriano G, Piantanida R, Pellini R, Muscatello L. Elective treatment of the neck in squamous cell carcinoma of the larynx: Clinical experience. *Head Neck* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2022 Jun 28];25(2):97–102. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hed.10170>
 32. Shah JP. Patterns of cervical lymph node metastasis from squamous carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Am J Surg*. 1990;160(4):405–9.
 33. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol*. 2010;11(1):21–8.
 34. Bonner J, Giralt J, Harari P, Spencer S, Schulten J, Hossain A, et al. Cetuximab and radiotherapy in laryngeal preservation for cancers of the larynx and hypopharynx a secondary analysis of a randomized clinical trial. *JAMA Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2016 Sep 1;142(9):842–9.
 35. Petrelli F, Coiu A, Riboldi V, Borgonovo K, Ghilardi M, Cabiddu M, et al. Concomitant platinum-based chemotherapy or cetuximab with radiotherapy for locally advanced head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis of published studies. Vol. 50, *Oral Oncology*. Elsevier Ltd; 2014. p. 1041–8.
 36. Harari PM, Harris J, Kies MS, Myers JN, Jordan RC, Gillison ML, et al. Postoperative chemoradiotherapy and cetuximab for high-risk squamous cell carcinoma of the head and neck: Radiation Therapy Oncology Group RTOG-0234. *J Clin Oncol*. 2014 Aug 10;32(23):2486–95.
 37. Siu LL, Waldron JN, Chen BE, Winquist E, Wright JR, Nabid A, et al. Effect of standard radiotherapy with cisplatin vs accelerated radiotherapy with panitumumab in locoregionally advanced squamous cell head and neck carcinoma a randomized clinical trial. In: *JAMA Oncology*. American Medical Association; 2017. p. 220–6.
 38. Ott PA, Bang YJ, Berton-Rigaud D, Elez E, Pishvaian MJ, Rugo HS, et al. Safety and antitumor activity of pembrolizumab in advanced programmed death ligand 1–positive endometrial cancer: Results from the KEYNOTE-028 study. *J Clin Oncol*. 2017 Aug 1;35(22):2535–41.
 39. Harrington K, Temam S, Mehanna H, D’Cruz A, Jain M, D’Onofrio I, et al. Postoperative adjuvant lapatinib and concurrent chemoradiotherapy

- followed by maintenance lapatinib monotherapy in high-risk patients with resected squamous cell carcinoma of the head and neck: A phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Oncol*. 2015 Dec 10;33(35):4202–9.
40. Cohen EEW, LaMonte SJ, Erb NL, Beckman KL, Sadeghi N, Hutcheson KA, et al. American Cancer Society Head and Neck Cancer Survivorship Care Guideline. *CA Cancer J Clin*. 2016 May;66(3):203–39.
 41. Xu R, Won JY, Kim CH, Kim DE, Yim H. Roles of the Phosphorylation of Transcriptional Factors in Epithelial-Mesenchymal Transition. Vol. 2019, *Journal of Oncology*. Hindawi Limited; 2019.
 42. Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. Vol. 1, *Annual Review of Pathology*. Annual Reviews Inc.; 2006. p. 119–50.
 43. Pietras K, Östman A. Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*. 2010;316:1324–31.
 44. Schiavoni G, Gabriele L, Mattei F. The tumor microenvironment: A pitch for multiple players. *Front Oncol*. 2013;3 APR.
 45. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):46–54.
 46. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. Vol. 20, *Nature Reviews Cancer*. Nature Research; 2020. p. 174–86.
 47. Weinberg RA. *La biologia del cancro*. prima ediz. 2016;617–27.
 48. Chen Y, McAndrews KM, Kalluri R. Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. Vol. 18, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Research; 2021. p. 792–804.
 49. Bonuccelli G, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Pavlides S, Pestell RG, Fatatis A, et al. The reverse Warburg effect: Glycolysis inhibitors prevent the tumor promoting effects of caveolin-1 deficient cancer associated fibroblasts. *Cell Cycle*. 2010 May 15;9(10):1960–71.
 50. Bever KM, Sugar EA, Bigelow E, Sharma R, Laheru D, Wolfgang CL, et al. The prognostic value of stroma in pancreatic cancer in patients receiving adjuvant therapy. *HPB*. 2015 Apr 1;17(4):292–8.
 51. van Pelt GW, Sandberg TP, Morreau H, Gelderblom H, van Krieken JHJM, Tollenaar RAEM, et al. The tumour–stroma ratio in colon cancer: the biological role and its prognostic impact. Vol. 73, *Histopathology*. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 197–206.
 52. Karpathiou G, Vieville M, Gavid M, Camy F, Dumollard JM, Magné N, et al. Prognostic significance of tumor budding, tumor-stroma ratio, cell nests size, and stroma type in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinomas. *Head Neck*. 2019 Jun 1;41(6):1918–27.
 53. Almangush A, Alabi RO, Troiano G, Coletta RD, Salo T, Pirinen M, et al.

- Clinical significance of tumor-stroma ratio in head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2021 Dec 1;21(1):480.
54. Niranjana KC, Sarathy NA. Prognostic impact of tumor-stroma ratio in oral squamous cell carcinoma - A pilot study. *Ann Diagn Pathol*. 2018 Aug 1;35:56–61.
 55. Zhang XL, Jiang C, Zhang ZX, Liu F, Zhang F, Cheng YF. The tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in nasopharyngeal cancer. *Oncol Res Treat*. 2014 Apr 17;37(9):480–4.
 56. Almangush A, Heikkinen I, Bakhti N, Mäkinen LK, Kauppila JH, Pukkila M, et al. Prognostic impact of tumour–stroma ratio in early-stage oral tongue cancers. *Histopathology*. 2018 Jun 1;72(7):1128–35.
 57. Grigore AD, Jolly MK, Jia D, Farach-Carson MC, Levine H. Tumor budding: The name is EMT. partial EMT. Vol. 5, *Journal of Clinical Medicine*. MDPI; 2016.
 58. Rani P, Gupta A, Mehrol C, Singh M, Khurana N, Passey J. Clinicopathological correlation of tumor-stroma ratio and inflammatory cell infiltrate with tumor grade and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of buccal mucosa and tongue in 41 cases with review of literature. *J Cancer Res Ther*. 2020 Apr 1;16(3):445–51.
 59. Zhang H, Sheng X, Zhang S, Gu X. The prognostic value of tumor budding in laryngeal squamous cell carcinoma. *Transl Cancer Res*. 2020 Jan 1;9(1):119–27.
 60. Mesker WE, Junggeburst JMC, Szuhai K, De Heer P, Morreau H, Tanke HJ, et al. The carcinoma-stromal ratio of colon carcinoma is an independent factor for survival compared to lymph node status and tumor stage. *Cell Oncol*. 2007;29(5):387–98.
 61. Kemi N, Eskuri M, Herva A, Leppänen J, Huhta H, Helminen O, et al. Tumour-stroma ratio and prognosis in gastric adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2018 Aug 14;119(4):435–9.
 62. Vangangelt KMH, Green AR, Heemskerk IMF, Cohen D, van Pelt GW, Sobral-Leite M, et al. The prognostic value of the tumor–stroma ratio is most discriminative in patients with grade III or triple-negative breast cancer. *Int J Cancer*. 2020 Apr 15;146(8):2296–304.
 63. Zong L, Zhang Q, Kong Y, Yang F, Zhou Y, Yu S, et al. The tumor-stroma ratio is an independent predictor of survival in patients with 2018 FIGO stage IIC squamous cell carcinoma of the cervix following primary radical surgery. *Gynecol Oncol*. 2020 Mar 1;156(3):676–81.
 64. Huijbers A, Tollenaar RAEM, Pelt GWV, Zeestraten ECM, Dutton S, McConkey CC, et al. The proportion of tumor-stroma as a strong prognosticator for stage II and III colon cancer patients: Validation in the victor trial. *Ann Oncol*. 2013;24(1):179–85.
 65. Mascitti M, Zhurakivska K, Togni L, Caponio VCA, Almangush A, Balercia P, et al. Addition of the tumour–stroma ratio to the 8th edition American Joint Committee on Cancer staging system improves survival

- prediction for patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2020 Nov 1;77(5):810–22.
66. Dourado MR, Miwa KYM, Hamada GB, Paranaíba LMR, Sawazaki-Calone Í, Domingueti CB, et al. Prognostication for oral squamous cell carcinoma patients based on the tumour–stroma ratio and tumour budding. *Histopathology*. 2020 May 1;76(6):906–18.
 67. van Pelt GW, Kjær-Frifeldt S, van Krieken JHJM, Al Dieri R, Morreau H, Tollenaar RAEM, et al. Scoring the tumor-stroma ratio in colon cancer: procedure and recommendations. *Virchows Arch*. 2018 Oct 20;473(4):405–12.
 68. Crispin JC, Tsokos GC. *Cancer immunosurveillance by CD8 T cells*. Vol. 9, F1000Research. F1000 Research Ltd; 2020.
 69. Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, Galon J. The prognostic impact of anti-cancer immune response: a novel classification of cancer patients. Vol. 33, *Seminars in immunopathology*. Springer; 2011. p. 335–40.
 70. Karpathiou G, Giroult JB, Forest F, Fournel P, Monaya A, Froudarakis M, et al. Clinical and histologic predictive factors of response to induction chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2016;146(5):546–53.
 71. Karpathiou G, Casteillo F, Giroult JB, Forest F, Fournel P, Monaya A, et al. Prognostic impact of immune microenvironment in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma: Immune cell subtypes, immunosuppressive pathways and clinicopathologic characteristics. *Oncotarget*. 2017;8(12):19310–22.
 72. Münz C. Autophagy proteins in antigen processing for presentation on MHC molecules. Vol. 272, *Immunological Reviews*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 17–27.
 73. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. *Cancer Immunoreveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity*. Vol. 90, *Advances in Immunology*. Academic Press; 2006. p. 1–50.
 74. O’Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. Vol. 16, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 151–67.
 75. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. Vol. 359, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2018. p. 1350–5.
 76. Hosseini A, Gharibi T, Marofi F, Babaloo Z, Baradaran B. CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy. Vol. 80, *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V.; 2020.
 77. Neel BG, Gu H, Pao L. The ‘Shp’ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. Vol. 28, *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd; 2003. p. 284–93.
 78. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME,

- White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009;114(8):1537–44.
79. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020;10(3):727–42.
 80. Sanmamed MF, Chen L. Inducible expression of B7-H1 (PD-L1) and its selective role in tumor site immune modulation. Vol. 20, *Cancer Journal (United States)*. Lippincott Williams and Wilkins; 2014. p. 256–61.
 81. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. Vol. 8, *Nature Immunology*. Nat Immunol; 2007. p. 239–45.
 82. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. Vol. 21, *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd; 2015. p. 24–33.
 83. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA, et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep*. 2017 May 9;19(6):1189–201.
 84. Sacher AG, Gandhi L. Biomarkers for the clinical use of PD-1/PD-L1 inhibitors in non-small-cell lung cancer: A review. Vol. 2, *JAMA Oncology*. American Medical Association; 2016. p. 1217–22.
 85. Dong P, Xiong Y, Yue J, Hanley SJB, Watari H. Tumor-intrinsic PD-L1 signaling in cancer initiation, development and treatment: Beyond immune evasion. Vol. 8, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
 86. Fulchiero E, Jimeno A. Nivolumab. Vol. 50, *Drugs of Today*. Prous Science; 2014. p. 791–802.
 87. Sznol M, Powderly JD, Smith DC, Brahmer JR, Drake CG, McDermott DF, et al. Safety and antitumor activity of biweekly MDX-1106 (Anti-PD-1, BMS-936558/ONO-4538) in patients with advanced refractory malignancies. *J Clin Oncol*. 2010 May 20;28:2506–2506.
 88. Ribas A, Hamid O, Daud A, Hodi FS, Wolchok JD, Kefford R, et al. Association of pembrolizumab with tumor response and survival among patients with advanced melanoma. In: *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association; 2016. p. 1600–9.
 89. Hutchinson L. Immunotherapy: Pembrolizumab - Is the writing on the wall for cancer? Vol. 12, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 371.
 90. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science (80-)*. 2017 Jul 28;357:409–13.
 91. Cramer JD, Burtneß B, Ferris RL. Immunotherapy for head and neck cancer: Recent advances and future directions. Vol. 99, *Oral Oncology*. Elsevier Ltd; 2019.
 92. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et

- al. PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 2015 Jan 22;372(4):311–9.
93. Nghiem PT, Bhatia S, Lipson EJ, Kudchadkar RR, Miller NJ, Annamalai L, et al. PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2016 Jun 30;374(26):2542–52.
 94. Eroglu Z, Zaretsky JM, Hu-Lieskovan S, Kim DW, Algazi A, Johnson DB, et al. High response rate to PD-1 blockade in desmoplastic melanomas. *Nature*. 2018 Jan 18;553(7688):347–50.
 95. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015 May 21;372(21):2018–28.
 96. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2015 Nov 5;373(19):1803–13.
 97. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10;375(19):1856–67.
 98. Jiang P, Gu S, Pan D, Fu J, Sahu A, Hu X, et al. Signatures of T cell dysfunction and exclusion predict cancer immunotherapy response. *Nat Med*. 2018 Oct 1;24(10):1550–8.
 99. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. Vol. 168, *Cell*. Cell Press; 2017. p. 707–23.
 100. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, Van Der Heijden MS, Balar A V., Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: A single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*. 2016 May 7;387(10031):1909–20.
 101. Robert C, Schachter J, Long G V., Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2521–32.
 102. Turajlic S, Litchfield K, Xu H, Rosenthal R, McGranahan N, Reading JL, et al. Insertion-and-deletion-derived tumour-specific neoantigens and the immunogenic phenotype: a pan-cancer analysis. *Lancet Oncol*. 2017 Aug 1;18(8):1009–21.
 103. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med*. 2018 Jan 11;378(2):158–68.
 104. Hoffman HT, Porter K, Karnell LH, Cooper JS, Weber RS, Langer CJ, et al. Laryngeal Cancer in the United States: Changes in Demographics, Patterns of Care, and Survival. 2006;
 105. Lucioni M, Marioni G, Bertolin A, Giacomelli L, Rizzotto G. Glottic laser surgery: Outcomes according to 2007 ELS classification. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2011 Dec;268(12):1771–8.

106. Franz L, Tealdo G, Contro G, Bandolin L, Carraro V, Giacomelli L, et al. Biological tumor markers (maspin, <scp>CD105</scp> , <scp>nm23-H1</scp>) and disease relapse in laryngeal cancer: cluster analysis. *Head Neck*. 2020;42(8):2129–36.
107. Marioni G, Ottaviano G, Lovato A, Franz L, Bandolin L, Contro G, et al. Expression of maspin tumor suppressor and mTOR in laryngeal carcinoma. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg*. 2020 Jan 1;41(1):102322.
108. Lovato A, Franz L, Carraro V, Bandolin L, Contro G, Ottaviano G, et al. Maspin expression and anti-apoptotic pathway regulation by bcl2 in laryngeal cancer. *Ann Diagn Pathol*. 2020;45.
109. Pietras K, Östman A. Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. Vol. 316, *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc.; 2010. p. 1324–31.
110. Wu J, Liang C, Chen M, Su W. Association between tumor-stroma ratio and prognosis in solid tumor patients: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(42):68954–65.
111. Karpathiou G, Gavid M, Prevot-Bitot N, Dhomps A, Dumollard JM, Vieville M, et al. Correlation Between Semiquantitative Metabolic Parameters After PET/CT and Histologic Prognostic Factors in Laryngeal and Pharyngeal Carcinoma. *Head Neck Pathol*. 2020 Sep 1;14(3):724–32.
112. Alessandrini L, Zanoletti E, Cazzador D, Sbaraglia M, Franz L, Tealdo G, et al. Tumor budding to investigate local invasion, metastasis and prognosis in temporal bone squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2022 Jan 1;229.
113. Alessandrini L, Franz L, Ottaviano G, Ghi MG, Lanza C, Blandamura S, et al. Prognostic role of programmed death ligand 1 (PD-L1) and the immune microenvironment in laryngeal carcinoma. *Oral Oncol*. 2020 Sep 1;108.
114. Cohen EEW, Bell RB, Bifulco CB, Burtneß B, Gillison ML, Harrington KJ, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *J Immunother Cancer*. 2019 Jul 15;7(1).
115. Franz L, Alessandrini L, Calvanese L, Crosetta G, Frigo AC, Marioni G. Angiogenesis, programmed death ligand 1 (PD-L1) and immune microenvironment association in laryngeal carcinoma. *Pathology*. 2021 Dec 1;53(7):844–51.
116. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol*. 2017 Sep 1;30(9):1299–311.
117. Almangush A, Salo T, Hagström J, Leivo I. Tumour budding in head and neck squamous cell carcinoma - a systematic review. Vol. 65, *Histopathology*. Histopathology; 2014. p. 587–94.
118. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G, et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with

- chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019 Nov 23;394(10212):1915–28.
119. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. 1991;
 120. van Pelt GW, Krol JA, Lips IM, Peters FP, van Klaveren D, Boonstra JJ, et al. The value of tumor-stroma ratio as predictor of pathologic response after neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal cancer. *Clin Transl Radiat Oncol*. 2020 Jan 1;20:39–44.
 121. Smit MA, van Pelt GW, Terpstra V, Putter H, Tollenaar RAEM, Mesker WE, et al. Tumour-stroma ratio outperforms tumour budding as biomarker in colon cancer: a cohort study. *Int J Colorectal Dis*. 2021 Dec 1;36(12):2729–37.
 122. Van Wyk HC, Park JH, Edwards J, Horgan PG, McMillan DC, Going JJ. The relationship between tumour budding, the tumour microenvironment and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016 Jul 12;115(2):156–63.
 123. Christofori G. New signals from the invasive front. Vol. 441, *Nature*. Nature Publishing Group; 2006. p. 444–50.
 124. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. Vol. 121, *Immunology*. Wiley-Blackwell; 2007. p. 1–14.
 125. Gujam FJA, Edwards J, Mohammed ZMA, Going JJ, McMillan DC. The relationship between the tumour stroma percentage, clinicopathological characteristics and outcome in patients with operable ductal breast cancer. *Br J Cancer*. 2014;111(1):157–65.
 126. Zadka Ł, Chabowski M, Grybowski D, Piotrowska A, Dzięgiel P. Interplay of stromal tumor-infiltrating lymphocytes, normal colonic mucosa, cancer-associated fibroblasts, clinicopathological data and the immunoregulatory molecules of patients diagnosed with colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2021 Sep 1;70(9):2681–700.
 127. Ravensbergen CJ, Polack M, Roelands J, Crobach S, Putter H, Gelderblom H, et al. Combined assessment of the tumor–Stroma ratio and tumor immune cell infiltrate for immune checkpoint inhibitor therapy response prediction in colon cancer. *Cells*. 2021 Nov 1;10(11).
 128. Ravensbergen CJ, Kuruc M, Polack M, Crobach S, Putter H, Gelderblom H, et al. The stroma liquid biopsy panel contains a stromal-epithelial gene signature ratio that is associated with the histologic tumor-stroma ratio and predicts survival in colon cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Jan 1;14(1).
 129. Zhuang Y, Liu C, Liu J, Li G. Resistance mechanism of PD-1/PD-L1 blockade in the cancer-immunity cycle. Vol. 13, *OncoTargets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd.; 2020. p. 83–94.
 130. El Dein Mohamed AS, El-Rebey HS, AboElnasr LSA, Abdou AG. The role and relationship between programmed death ligand 1 and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 immunohistochemical expression in

colorectal carcinoma patients: An impact on outcome. *Ecancermedicalsecience*. 2021;15.

131. Zou MX, Zheng BW, Liu FS, Wang X Bin, Hu JR, Huang W, et al. The Relationship between Tumor-Stroma Ratio, the Immune Microenvironment, and Survival in Patients with Spinal Chordoma. *Clin Neurosurg*. 2019 Dec 1;85(6):E1095–109.
132. Davies LC, Heldring N, Kadri N, Le Blanc K. Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. *Stem Cells*. 2017 Mar 1;35(3):766–76.
133. Fasano M, Corte CM Della, Liello R Di, Viscardi G, Sparano F, Iacovino ML, et al. Immunotherapy for head and neck cancer: Present and future. Vol. 174, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd; 2022.
134. Takigawa H, Kitadai Y, Shinagawa K, Yuge R, Higashi Y, Tanaka S, et al. Multikinase inhibitor regorafenib inhibits the growth and metastasis of colon cancer with abundant stroma. *Cancer Sci*. 2016 May 1;107(5):601–8.
135. Modica C, Tortarolo D, Comoglio PM, Basilico C, Vigna E. MET/HGF co-targeting in pancreatic cancer: A tool to provide insight into the tumor/stroma crosstalk. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il mio Relatore, il Prof. Gino Marioni, e la correlatrice, la Dott.ssa Lara Alessandrini, per avermi dato l'opportunità di partecipare alla stesura dell'articolo "*Tumor-Stroma Ratio and Programmed Cell Death Ligand 1 expression in preoperative biopsy and matched laryngeal carcinoma surgical specimen*" e per l'enorme disponibilità da loro dimostrata.

Tengo inoltre a ringraziare i miei familiari e tutti coloro che mi sono stati vicino e che mi hanno supportato durante questo lungo percorso.