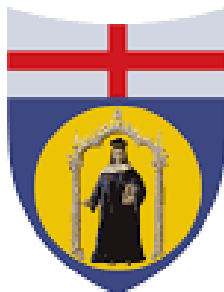


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE



CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

TESI DI LAUREA

**Analisi del repertorio linfocitario in pazienti con tumori
gastrici mediante citometria di massa e correlazione con la
risposta alla chemioterapia perioperatoria.**

Relatore:
Prof.ssa Lucia Del Mastro

Candidato:
Mirko Giuriola

Co-relatore:
Prof.ssa Chiara Vitale

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

*Dedicato alla
mia famiglia*

Sommario

1. INTRODUZIONE	3
1.1. Patogenesi	4
1.2. Familiarità ed ereditarietà	5
1.3. Classificazioni	7
1.4. Clinica e diagnosi	10
1.5. Stadiazione	11
1.6. Trattamento	12
1.6.1. Trattamento della malattia localizzata	12
1.6.2. Trattamento della malattia avanzata e metastatica	13
1.7. Immunoterapia nel tumore gastrico	14
1.7.1. Tessuto linfoide terziario	19
1.7.2. Potenziale terapeutico delle cellule NK nel carcinoma gastrico	20
1.8. Citometria di massa	26
2. OBIETTIVI	28
3. MATERIALI E METODI	29
3.1. Reclutamento dei pazienti affetti da tumore gastrico e donatori sani	29
3.2. Disegno dello studio	30
3.3. Isolamento di PBMC e del plasma	31
3.4. Analisi di citometria di massa su PBMC	31
3.4.1. Protocollo di staining per campioni di PBMC	32
3.4.2. Anticorpi monoclonali	32
3.4.3. Acquisizione del campione	33
3.4.4. Processamento file e analisi dati	33
3.5. Analisi del tessuto gastrico all'intervento	33
4. RISULTATI	34
4.1. Caratterizzazione del repertorio leucocitario isolato da sangue periferico tramite citometria di massa con focus su linfociti T e NK	34
4.2. La chemioterapia non influenza il repertorio linfocitario dei pazienti che però evidenziano un repertorio T e NK significativamente diversi tra loro	39
4.3. Valutazione dell'infiltrato linfocitario nel tessuto tumorale e confronto con il repertorio osservato nel sangue periferico: caso del paziente Re018	46
5. DISCUSSIONE	50
6. BIBLIOGRAFIA	53
7. RINGRAZIAMENTI	58

1. INTRODUZIONE

Il carcinoma gastrico rimane uno dei tumori più comuni e mortali in tutto il mondo, in particolare nei paesi sviluppati e soprattutto nella popolazione maschile dopo i 60 anni. Nel mondo, il tumore gastrico è il quinto per incidenza (0,968 milioni di nuovi casi) e per mortalità (0,659 milioni di decessi), secondo le statistiche globali sul cancro GLOBOCAN 2022 [1]. Il tasso di incidenza standardizzato per età è circa due volte superiore nei maschi rispetto alle femmine. Esiste una notevole variazione geografica: il tasso di incidenza è più alto in Asia (14,3 casi/100.000), seguito dall'America Latina e dai Caraibi, dall'Europa e dall'Oceania, ed è più basso in Africa e Nord America [2]. Anche in Europa esiste una notevole variabilità geografica e l'Italia, insieme a Spagna, Romania e Slovacchia, fa parte dei paesi europei a incidenza intermedia (incidenza tra 10 e 20 casi/100.000) [3]. Secondo i dati che emergono dal rapporto "I numeri del cancro in Italia 2022", nel 2022 ci sono state circa 14.700 nuove diagnosi, con una maggiore incidenza negli uomini, e sono stati stimati 9.900 decessi. Nei maschi in Italia nel 2022 il tumore dello stomaco ha occupato il quinto posto in ordine di incidenza con circa 8.800 casi, mentre nelle donne l'incidenza è stata minore, occupando il settimo posto con 5.900 casi [4]. In Italia, il picco d'incidenza si aggira intorno alla VII decade e la sopravvivenza a 5 anni è di circa il 32% [3].

Nonostante negli ultimi anni i casi in Italia siano in diminuzione grazie ai miglioramenti nella diagnosi e nel controllo dei fattori di rischio come l'eradicazione dell'*Helicobacter pylori*, il tumore gastrico mantiene un alto tasso di mortalità, rendendo necessarie strategie di controllo e trattamento più efficaci [5].

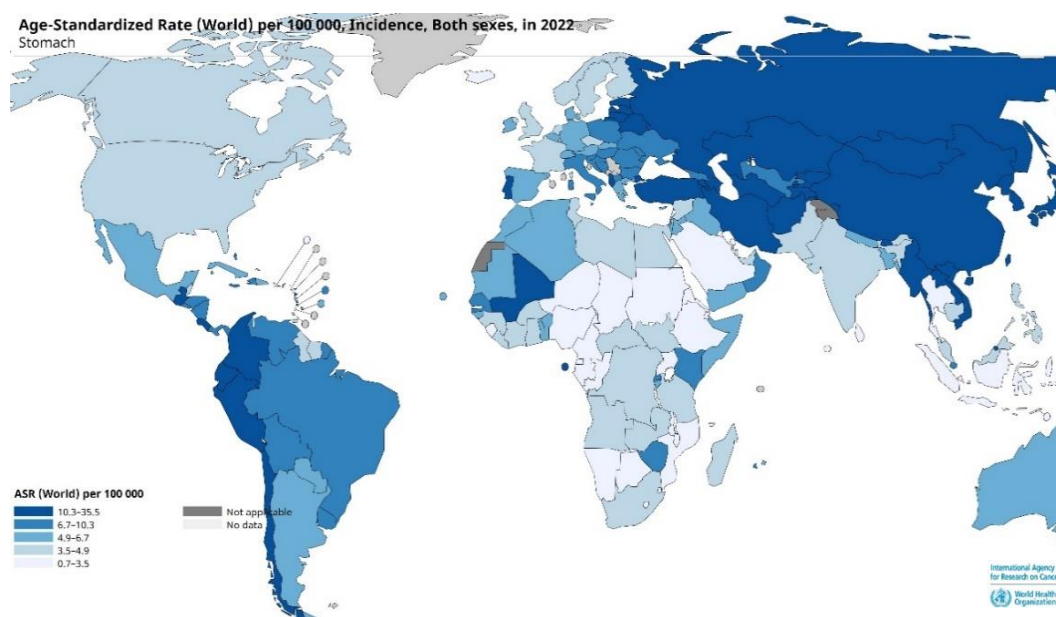


Figura 1. Incidenza del tumore gastrico nel mondo nel 2022. Tasso di incidenza standardizzato per età per 100.000 abitanti, in entrambi i sessi. Source: GLOBOCAN 2022.

1.1. Patogenesi

L'eziologia del tumore gastrico è multifattoriale: nello sviluppo della malattia intervengono sia fattori genetici sia fattori ambientali.

L'*Helicobacter pylori* è uno dei principali fattori di rischio per il cancro gastrico: l'infezione da *H. pylori* è molto diffusa e si stima che almeno il 50% degli adulti in tutto il mondo ospiti l'infezione. L'infezione è prevalentemente acquisita nella prima infanzia e rimane presente per tutta la vita se non trattata con antibiotici. Nella maggior parte dei pazienti portatori l'infezione da *H. pylori* rimane asintomatica.

H. pylori è un batterio Gram-negativo definito cancerogeno di classe I per lo sviluppo di cancro gastrico dall'Organizzazione Mondiale della Sanità dal 1994. Due sono i principali meccanismi di oncogenesi: la reazione infiammatoria cronica della mucosa gastrica conseguente all'infezione e i fattori di virulenza batterio-specifici, in particolare la tossina CagA e la tossina VacA. I ceppi di *H. pylori* variano nella loro patogenicità e cancerogenicità. I ceppi più virulenti sono quelli che trasportano il gene *cagA*. Questo gene si trova in una zona particolare del genoma batterico detta isola di patogenicità del gene associata alla citotossina (*cagPAI*), che contiene più di 30 geni, tra cui alcuni che codificano per un sistema di secrezione di tipo IV (T4SS), il quale agisce come una siringa molecolare per iniettare la proteina batterica CagA nel citoplasma della cellula gastrica ospite. Una volta traslocata nel citoplasma, CagA può influenzare numerose vie intracellulari con diversi effetti: può indurre il rilascio di citochine da parte delle cellule gastriche stimolando la risposta infiammatoria; può influenzare la proliferazione cellulare; può indurre ipermetilazione di geni oncosoppressori, disattivandoli. Anche la tossina VacA è un importante fattore di virulenza essendo responsabile di suscitare molteplici effetti sulle cellule ospiti, tra cui la vacuolizzazione, la necrosi e l'apoptosi. In particolare, l'induzione dell'apoptosi mediata da *H. pylori* nelle cellule epiteliali gastriche può svolgere un ruolo non solo nel danno gastrico, ma anche nello sviluppo dell'atrofia gastrica e del cancro. Questi meccanismi, infatti, inducono cambiamenti consecutivi nella mucosa gastrica che sono noti come "cascata di Correa". Tale cascata di eventi inizia con la gastrite cronica indotta e può evolvere in gastrite atrofica, metaplasia intestinale, displasia e infine in adenocarcinoma gastrico. Tuttavia, solo in una minoranza di individui affetti si verifica la cascata di Correa, suggerendo che l'infezione da sola non sia sufficiente per indurre l'adenocarcinoma gastrico, ma siano necessari altri fattori, tra i quali fattori ambientali, variazioni genetiche ed epigenetiche [6, 7].

Di seguito un elenco di altri fattori di rischio noti:

- *Obesità addominale.* L'aumento del tessuto adiposo viscerale determina un incrementata produzione di citochine che facilitano lo sviluppo di insulino-resistenza e conseguente iperinsulinemia. Questo promuove la carcinogenesi stimolando l'aumento dell'espressione del fattore di crescita insulino-simile (IGF-1) [8].
- *Fattori dietetici.* L'eccessivo consumo di carne rossa e lavorata si associa ad un aumentato rischio di carcinoma gastrico in quanto la carne rossa è ricca di ferro eme e di composti di nitrati e nitriti, che contribuiscono alla formazione di composti N-nitroso cancerogeni (NOC). Inoltre, l'alta temperatura durante la cottura della carne può produrre ammine eterocicliche e idrocarburi policiclici aromatici [9]. Al contrario, il consumo di frutta e verdura è stato associato a un ridotto rischio di cancro gastrico, grazie alla presenza di vitamine antiossidanti (vitamina A, C, E, β -carotene e α -carotene) in grado di eliminare i radicali liberi e ridurre il danno ossidativo cellulare [8].
- *Fumo di sigaretta.* Il fumo di sigaretta contiene diversi componenti cancerogeni. Inoltre, è un induttore di infiammazione cronica del tratto gastrointestinale attraverso l'alterazione della proliferazione delle cellule mucose e l'aumento del rischio di infezione batterica o virale, che può contribuire ulteriormente alla cancerogenesi [10].
- *Alcool.* È noto che l'alcool irrita la mucosa gastrica, provocando gastrite, che può essere un precursore del cancro allo stomaco [11].
- *Infezioni virali.* Il virus di Epstein-Barr (EBV) infetta i linfociti B e le cellule epiteliali. Il 90% della popolazione adulta ha un'infezione latente da EBV, che nella maggior parte dei casi rimane asintomatica per tutta la vita grazie al controllo dell'infezione ad opera dei linfociti T citotossici. Quando il sistema immunitario è compromesso, le cellule EBV-positive iniziano a proliferare. Attraverso la migrazione delle cellule B infettate, l'EBV sembra infettare anche le cellule epiteliali gastriche. L'espressione dei geni EBV nelle cellule epiteliali infettate conferisce proprietà proliferative e resistenza all'apoptosi. Le cellule che sfuggono all'eliminazione immunologica possono così iniziare a proliferare [12].
Anche altri virus come HBV, HCV, HPV e CMV sono stati associati ad una maggiore incidenza di tumore gastrico [8].

1.2. Familiarità ed ereditarietà

Circa il 10-20% dei pazienti con carcinoma gastrico mostra una storia familiare di malattia e circa il 2-5% dei casi di carcinoma gastrico insorge nell'ambito di una sindrome ereditaria predisponente. Le tre principali sindromi di predisposizione ereditaria al

carcinoma gastrico sono il carcinoma gastrico ereditario diffuso (HDGC), il carcinoma gastrico intestinale familiare (FIGC) e l'adenocarcinoma gastrico con poliposi prossimale dello stomaco (GAPPS) [13].

- *Sindrome ereditaria del carcinoma gastrico diffuso (HDGC)*

È una sindrome a trasmissione autosomica dominante caratterizzata da un'elevata prevalenza di carcinoma gastrico diffuso e carcinoma mammario lobulare. Nella maggior parte dei casi è determinata da una mutazione germinale inattivante dell'oncosoppressore CDH1, che codifica per la E-caderina, una proteina transmembrana che è localizzata a livello delle giunzioni cellulari ed è coinvolta nell'adesione cellulare e nella trasduzione di segnale. In una minoranza di casi di HDGC sono coinvolte mutazioni a carico del gene CTNNA1, codificante per la α -catenina, una proteina delle giunzioni aderenti tra le cellule [13].

- *Carcinoma gastrico intestinale familiare (FIGC)*

È un carcinoma gastrico di tipo intestinale a trasmissione autosomica dominante. Le basi genetiche rimangono sconosciute [14].

- *Adenocarcinoma gastrico con poliposi prossimale dello stomaco (GAPPS)*

È una sindrome rara con un'ereditarietà di tipo autosomica dominante. La GAPPS è caratterizzata da poliposi gastrica prossimale e rischio di adenocarcinoma di tipo intestinale ad esordio precoce del corpo dello stomaco, in assenza di poliposi nelle regioni antrale, duodenale e coloretale. La GAPPS è causata da una mutazione puntiforme nella regione promotrice 1B del gene oncosoppressore APC [15].

Il cancro dello stomaco può manifestarsi nel contesto di sindromi tumorali come la sindrome di Lynch (LS), la poliposi adenomatosa familiare (FAP), la sindrome di Li-Fraumeni (LFS), la sindrome da poliposi giovanile (JPS), la sindrome di Peutz-Jeghers (PJS) e la sindrome ereditaria del cancro al seno e alle ovaie (HBOCS) [14]. La sindrome di Lynch (LS) è la principale sindrome tumorale predisponente allo sviluppo del carcinoma gastrointestinale. In particolare, il rischio di sviluppare il tumore dello stomaco varia dall'11 al 19%. Alla base c'è una trasmissione autosomica dominante di mutazioni nei geni del sistema di riparazione del mismatch del DNA (MMR), come MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. La perdita di funzione del sistema MMR porta ad instabilità genomica, soprattutto in particolari sequenze ripetute del genoma, chiamate microsatelliti. L'alterato numero di sequenze dei microsatelliti è chiamato instabilità dei microsatelliti (MSI). L'MSI porta all'attivazione di oncogeni e all'inattivazione di geni oncosoppressori e provoca una carcinogenesi accelerata [14, 16].

1.3. Classificazioni

Da un punto di vista anatomico, lo stomaco si divide in quattro regioni principali: cardias, fondo, corpo e antro. In base alla localizzazione anatomica, si distinguono due tipi di tumori gastrici: (1) tumori del cardias (o prossimali); (2) tumori non-cardias (o distali).

L'insorgenza dei tumori distali è diminuita negli ultimi decenni, mentre è aumentata l'insorgenza dei tumori prossimali, soprattutto nei paesi industrializzati, probabilmente in associazione con la malattia da reflusso gastroesofageo. Per quanto riguarda i tumori della giunzione gastroesofagea (GEJ), che coinvolgono un segmento di 10 cm comprendente i 5 cm distali dell'esofago e i 5 cm prossimali dello stomaco con al centro la GEJ, l'*American Joint Commission on Cancer Classification* (VII edizione AJCC Cancer Staging Manual) ha deciso di classificare come carcinomi esofagei i tumori che coinvolgono la GEJ e i 5 cm prossimali dello stomaco, mentre i tumori che si localizzano nei 5 cm prossimali dello stomaco ma non coinvolgono la GEJ o l'esofago sono considerati tumori gastrici. Tuttavia, essendo stati inclusi in numerosi trial clinici sul tumore dello stomaco, i tumori che coinvolgono la GEJ tendono ad essere trattati come i tumori gastrici [17, 18].

Si possono distinguere tre entità anatomo-topografiche di tumori della GEJ, proposte da Siewert et al. nel 1987: il tipo I o adenocarcinoma dell'esofago distale, in cui il centro della neoplasia è collocato tra 1 e 5 cm prossimalmente al cardias; il tipo II o carcinoma vero del cardias, in cui il centro del tumore è localizzato tra 1 cm prossimalmente e 2 cm distalmente rispetto al cardias; il tipo III o carcinoma gastrico sottocardiale, in cui il centro del tumore si trova tra 2 e 5 cm distalmente al cardias. Il tipo I e II presentano caratteristiche istopatologiche e biologiche più affini al cancro esofageo, mentre il tipo III risulta più affine al cancro gastrico [3].

Il 90% dei tumori gastrici maligni epiteliali è rappresentato dall'adenocarcinoma. Da un punto di vista istologico ci sono due classificazioni principali del tumore dello stomaco:

- la classificazione di Lauren;
- la classificazione WHO.

La classificazione di Lauren è stata istituita nel 1965 e distingue due sottotipi istologici di adenocarcinoma gastrico: intestinale e diffuso. Successivamente, è stato introdotto anche il tipo indeterminato per indicare quelle forme poco frequenti che non rientrano né nel tipo intestinale né nel tipo diffuso. Il carcinoma gastrico intestinale è caratterizzato da cellule tumorali adese, che formano strutture ghiandolari: in genere crescono lungo fronti ampi e coesivi a formare una massa esofitica o un tumore ulcerato. Si sviluppa tipicamente a partire da un quadro di gastrite atrofica, spesso con metaplasia intestinale.

Colpisce soprattutto l'antro pilorico e presenta una prognosi migliore. Il carcinoma gastrico diffuso, invece, presenta delle cellule tumorali poco coese che infiltrano lo stroma singolarmente o in piccoli gruppi. Le cellule tumorali del carcinoma gastrico diffuso contengono abbondante mucina che espande il citoplasma e spinge il nucleo alla periferia, creando una cellula a castone. Può essere difficile apprezzare una massa nel carcinoma gastrico diffuso, mentre spesso questi tumori infiltrativi scatenano una reazione desmoplastica che irrigidisce la parete gastrica [19, 20] [21].

La classificazione della World Health Organization (WHO) è stata introdotta nel 2010 ed è la classificazione più dettagliata. Oltre agli adenocarcinomi, la WHO descrive altri tipi di tumore gastrico con frequenza ridotta. Nell'ambito dell'adenocarcinoma gastrico, inoltre, si distinguono più sottogruppi, come il carcinoma tubulare, mucinoso, papillare e misto. Secondo la classificazione WHO, il sottotipo di adenocarcinoma gastrico più comune è quello tubulare, seguito dal tipo papillare e mucinoso. Vengono descritti altri sottotipi di adenocarcinoma gastrico, definiti "non comuni" a causa della loro scarsa importanza clinica. Il carcinoma con cellule a castone rappresenta circa il 10% dei carcinomi gastrici e rientra nei carcinomi gastrici scarsamente coesivi [21].

La classificazione del tumore gastrico basata sulle caratteristiche macroscopiche è diversa per il carcinoma in stadio iniziale (*Early Gastric Cancer* – EGC) rispetto al carcinoma in fase avanzata. L'EGC viene definito come qualsiasi adenocarcinoma invasivo confinato alla mucosa o alla sottomucosa, indipendentemente dalla presenza o meno di metastasi linfonodali. L'EGC presenta una prognosi migliore rispetto al carcinoma avanzato, con una sopravvivenza del 90% a 5 anni.

La classificazione macroscopica endoscopica dell'EGC della *Japanese Gastroenterological Endoscopic Society* (J.G.E.S.) individua tre tipi principali in base alla morfologia (*Figura 2*): 0-I (protrudente); 0-II (superficiale); 0-III (escavato) [22]. L'aspetto macroscopico del carcinoma avanzato viene definito secondo la classificazione di Bormann (*Figura 3*) come polipoide senza ulcerazione (tipo I), ulcerato con bordi elevati (tipo II), ulcerato con infiltrazione alla base (tipo III) e diffusamente infiltrato con ispessimento della parete (tipo IV) [22].

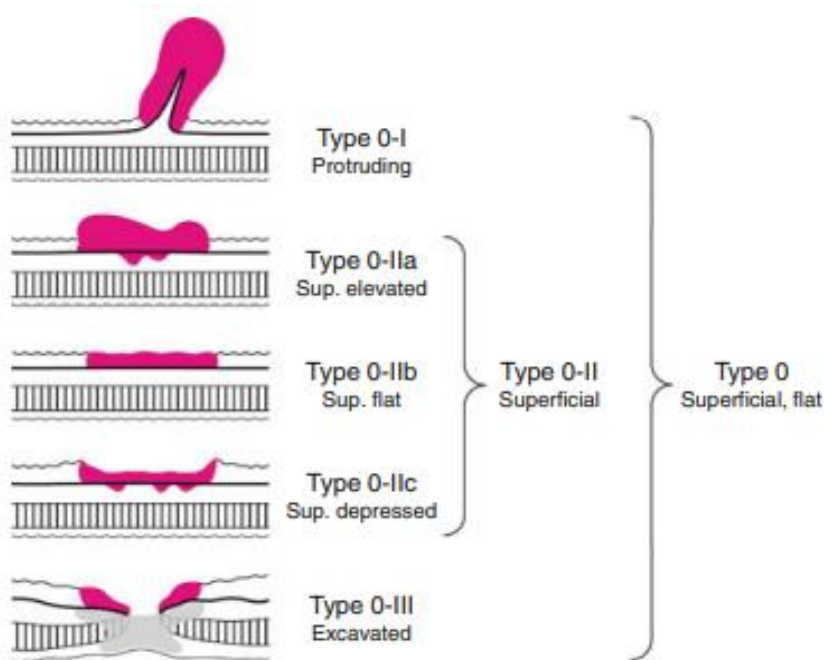


Figura 2. Classificazione macroscopica endoscopica dell'Early Gastric Cancer. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. Gastric Cancer. 2011.

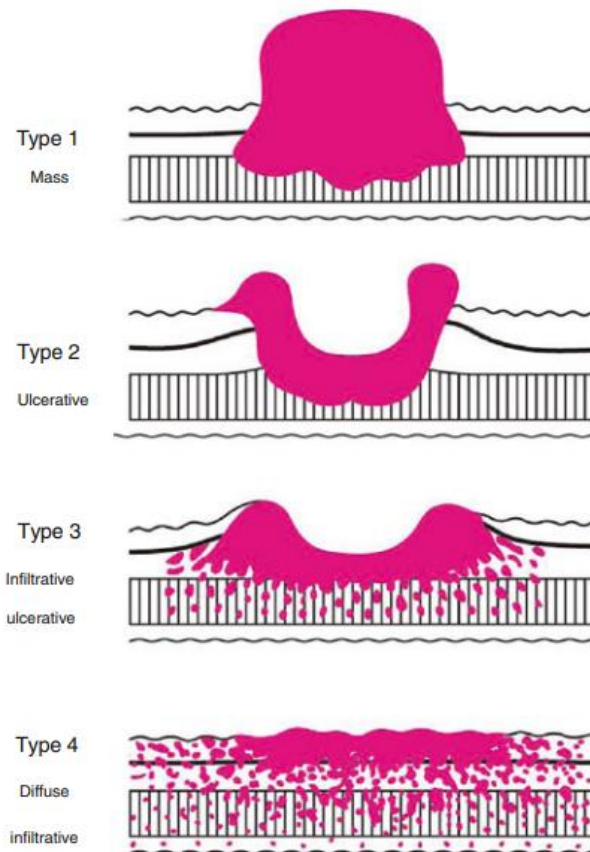


Figura 3. Tipi macroscopici di carcinoma gastrico avanzato. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. Gastric Cancer. 2011.

Negli ultimi decenni, sono state proposte classificazioni del carcinoma gastrico basate sul profilo di espressione molecolare. La prima è stata pubblicata nel 2014 nell'ambito del progetto *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*. È stata eseguita una valutazione molecolare completa di 295 adenocarcinomi gastrici che ha permesso di definire quattro sottotipi: Epstein-Barr virus positivi (9%), con instabilità dei microsatelliti (22%), genomicamente stabili (20%), con instabilità cromosomica (50%) [23].

1.4. Clinica e diagnosi

Il carcinoma gastrico può decorrere per lungo tempo asintomatico o con sintomi lievi e aspecifici, rendendo difficile una diagnosi precoce nella maggior parte dei casi. I primi sintomi sono in genere dei generici disturbi digestivi, come dispepsia, rigurgito, sazietà precoce, digestione prolungata. Altre volte il quadro clinico esordisce con sintomi di carattere generale, come astenia, calo ponderale e anoressia. Talvolta, la prima manifestazione del carcinoma gastrico può essere un'anemia da carenza di ferro oppure, meno frequentemente, un episodio emorragico con ematemesi e/o melena. Nei tumori localizzati a livello del cardias e nei tumori della GEJ, il sintomo principale può essere la disfagia, mentre nei tumori localizzati nel piloro si possono avere sintomi di ostruzione pilorica. Nelle fasi più avanzate della malattia, i sintomi sia gastrointestinali sia di carattere generale diventano più marcati e frequenti. Inoltre, nei casi molto avanzati, il carcinoma gastrico può essere identificato per le sue manifestazioni da diffusione metastatica, come ad esempio le tumefazioni da coinvolgimento linfonodale, soprattutto in regione sopraclavicolare sinistra (linfonodo di Virchow), oppure a livello pre-rettale (segno di Blumer), o ancora in regione periombelicale a formare un nodulo sottocutaneo, detto nodulo di suor Mary Joseph, dal nome dell'infermiera che per prima identificò questa lesione come marcatore di carcinoma metastatico. Nella donna, una possibile manifestazione metastatica è il coinvolgimento bilaterale delle ovaie (tumori di Krukenberg), riscontrabile come una tumefazione ovarica all'esplorazione ginecologica [20] [22] [24].

Anche se poco frequenti, talvolta si possono osservare delle sindromi paraneoplastiche, tra cui l'anemia emolitica microangiopatica, la cheratosi seborroica (segno di Leser-Trelat), l'*achantosis nigricans* e la coagulopatia intravascolare disseminata con possibile trombosi arteriosa e/o venosa (sindrome di Trousseau) [24].

L'esame endoscopico con esofagogastroduodenoscopia (EGDS) e le biopsie sono il *gold standard* per la diagnosi del carcinoma gastrico. Le biopsie dovrebbero essere multiple (almeno 5-8) per fornire il materiale necessario per le analisi istologiche e molecolari [22]. La valutazione immunoistochimica dell'espressione del *Human Epidermal growth factor Receptor 2* (HER2) e del fenotipo RER (*Replication Errors*) associato a instabilità dei microsatteliti, viene ora eseguita di routine poiché questi marcatori possono avere conseguenze terapeutiche [7].

1.5. Stadiazione

La stadiazione del carcinoma gastrico si basa sull’VIII edizione del sistema TNM dell’*American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (Figura 4). Il sistema TNM si basa su tre informazioni: l’estensione del tumore (T), la diffusione ai linfonodi limitrofi (N) e la presenza di metastasi a distanza (M). Mettendo insieme queste informazioni si ottiene lo stadio del tumore. Di solito, viene prima assegnato uno stadio clinico, basato su l’esame obiettivo, l’emocromo completo, i test di funzionalità epatica e renale, l’endoscopia e la TC con mezzo di contrasto di torace, addome ed eventualmente pelvi. La sensibilità della TC per la stadiazione linfonodale è variabile e, in ogni caso, l’ecoendoscopia (EUS) si è dimostrata più sensibile per la stadiazione N rispetto alla TC. Nel sospetto di metastasi peritoneali si può eseguire una laparoscopia esplorativa. La FDG-PET-TC non è raccomandata di routine [22] [25].

Primary tumour (T)		Regional lymph nodes (N)		Distant metastasis (M)	
TX	Primary tumour cannot be assessed	NX	Regional lymph node(s) cannot be assessed	M0	No distant metastasis
T0	No evidence of primary tumour	N0	No regional lymph node metastasis	M1	Distant metastasis ^d
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepithelial tumour without invasion of the lamina propria, high grade dysplasia	N1	Metastasis in 1-2 regional lymph nodes		
T1	Tumour invades lamina propria, muscularis mucosae or submucosa	N2	Metastasis in 3-6 regional lymph nodes		
T1a	Tumour invades lamina propria or muscularis mucosae	N3	Metastasis in 7 or more regional lymph nodes		
T1b	Tumour invades submucosa	N3a	Metastasis in 7-15 regional lymph nodes		
T2	Tumour invades muscularis propria	N3b	Metastasis in 16 or more regional lymph nodes		
T3	Tumour invades subserosa				
T4	Tumour perforates serosa (visceral peritoneum) or invades adjacent structures ^{a,b,c}				
T4a	Tumour perforates serosa				
T4b	Tumour invades adjacent structures ^{a,b}				

Stage grouping	T stage	N stage	M stage
Stage 0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1	N0	M0
Stage IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
Stage IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
Stage IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3a	M0
Stage IIIA	T4b	N0	M0
	T4a	N1-2	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3a	M0
Stage IIIB	T4b	N1-2	M0
	T3-4a	N3a	M0
	T1-2	N3b	M0
Stage IIIC	T4b	N3a-3b	M0
	T3-4a	N3b	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1

Figura 4. Stadiazione TNM del tumore gastrico (AJCC/UICC VIII edizione). Lordick F, Carneiro F, Cascinu S, et al. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2022.

1.6. Trattamento

La gestione del paziente con carcinoma gastrico richiede un team multidisciplinare che includa la figura del chirurgo, dell'oncologo, del gastroenterologo, del radiologo, del patologo e di altri specialisti [22].

1.6.1. Trattamento della malattia localizzata

Le linee guida ESMO 2022 raccomandano che in pazienti con carcinoma gastrico T1a ben differenziato, di diametro non superiore a 2 cm, N0 e M0, in assenza di ulcera intralesionale, la resezione endoscopica dovrebbe essere presa in considerazione come prima opzione rispetto alla chirurgia tradizionale. Nella pratica clinica vengono utilizzate due forme di resezione endoscopica: la resezione mucosale endoscopica (EMR) e la dissezione submucosale endoscopica (ESD). I tumori T1 che non soddisfano i criteri per la resezione endoscopica richiedono un intervento chirurgico di gastrectomia totale o subtotale distale con una linfadenectomia D1+. I tumori in stadio IB-III, >T1 e/o N⁺, necessitano di un trattamento multimodale basato sulla gastrectomia radicale con linfadenectomia D1 o D2 e sulla chemioterapia peri-operatoria. La linfadenectomia D1 implica l'asportazione dei linfonodi perigastrici più quelli lungo l'arteria gastrica sinistra. La linfadenectomia D1+ e quella D2 implicano la rimozione di ulteriori linfonodi lungo l'arteria epatica propria o comune, l'arteria splenica o l'asse celiaco. Le linee guida raccomandano che i pazienti con malattia resecabile dovrebbero sottoporsi a resezione D2 in centri specializzati ad alto volume. Dagli inizi degli anni 2000, la chemioterapia peri-operatoria è stata introdotta in Europa e in molti paesi occidentali come standard di cura del tumore gastrico operabile radicalmente in stadio \geq IB, dopo che due studi, uno condotto nel Regno Unito (MAGIC) e uno francese (FNCLCC/FFCD trial), ne hanno dimostrato il vantaggio in termini di sopravvivenza. Lo studio MAGIC ha dimostrato un miglioramento della sopravvivenza a 5 anni dal 23% al 36% in pazienti con carcinoma gastrico resecabile in stadio II e III trattati con sei cicli (tre pre-operatori e tre post-operatori) di ECF, ovvero epirubicina-cisplatino-5fluorouracile (5FU), rispetto alla sola chirurgia. Lo studio francese successivo [26] ha riportato risultati simili, utilizzando però cisplatino-5FU come regime perioperatorio. In tempi più recenti, uno studio tedesco [27] ha confrontato l'uso di otto cicli perioperatori di FLOT (5FU-leucovorin-oxaliplatino-docetaxel) rispetto a sei cicli di ECF/epirubicina-cisplatino-capecitabina (ECX). I risultati hanno mostrato un miglioramento significativo dell'endpoint primario di *overall survival* (OS) con una mediana di 50 mesi con l'uso di FLOT contro 35 mesi con l'uso di ECF/ECX. L'uso perioperatorio di FLOT (quattro cicli pre-operatori e quattro cicli post-

operatori) è pertanto diventato lo standard terapeutico nei tumori gastrici e della GEJ in stadio \geq IB [22].

Per i pazienti che non sono resecabili per controindicazioni si pone l'indicazione a chemioterapia personalizzata [3].

1.6.2. Trattamento della malattia avanzata e metastatica

Il trattamento di scelta del tumore gastrico localmente avanzato e per i pazienti con malattia in fase metastatica è rappresentato dalla chemioterapia, che ha dimostrato migliorare la sopravvivenza rispetto alla sola terapia di supporto. La chemioterapia di prima linea è rappresentata dalla combinazione tra un derivato del platino (cisplatino o oxaliplatino) e una fluoropirimidina (5-FU in infusione o capecitabina per os). L'irinotecan può essere considerato come valida alternativa nei pazienti che non tollerano i composti del platino [22].

Lo studio V325 ha confrontato la combinazione di docetaxel, cisplatino e 5-FU (DCF) con la doppietta cisplatino e 5-FU (CF) con obiettivo primario il tempo alla progressione (TTP). La tripletta DCF si è dimostrata superiore, ma è stata associata ad un aumento della tossicità ematologica. Di conseguenza, la tripletta non è raccomandata come approccio standard di prima scelta [28].

Sulla base dei risultati dello studio di fase III ToGA, nei pazienti con carcinoma gastrico HER2⁺ è raccomandata l'aggiunta di trastuzumab alla chemioterapia [29].

Nei pazienti con carcinoma gastrico in progressione dopo trattamento di prima linea, può essere preso in considerazione un trattamento chemioterapico di seconda linea, scegliendo tra paclitaxel, docetaxel e irinotecan, a cui viene aggiunta una terapia antiangiogenetica con ramucirumab, un anticorpo anti-VEGFR2, sulla base dei risultati dello studio di fase III RAINBOW [30].

Come terza linea terapeutica, nei pazienti con un buon performance status (ECOG 0-1) dovrebbe essere preso in considerazione il trattamento con trifluoridina/tipiracil, la cui efficacia è stata dimostrata dallo studio TAGS [31].

1.7. Immunoterapia nel tumore gastrico

Il tumore è un processo evolutivo che coinvolge interazioni costanti, dinamiche e reciproche tra le cellule tumorali e il microambiente tumorale (TME), ovvero l'insieme di cellule non cancerose e componenti non cellulari del tumore. Le cellule del sistema immunitario infiltrano il TME svolgendo un ruolo essenziale nell'immunosorveglianza e contribuendo alla modulazione della progressione tumorale. L'ipotesi dell'*immunoediting* è stata proposta all'inizio degli anni 2000 per spiegare le complesse interazioni tra cellule tumorali e cellule del sistema immunitario. L'*immunoediting* del tumore si basa su tre fasi: eliminazione, equilibrio e fuga. Nella fase di eliminazione, le cellule del sistema immunitario innato e adattativo riconoscono e distruggono le cellule tumorali, svolgendo un'azione di immunosorveglianza che può portare all'eliminazione del tumore [32]. Tuttavia, alcune cellule tumorali possono sopravvivere alla fase di eliminazione ed entrano nella fase successiva di equilibrio, in cui le cellule neoplastiche sono mantenute dormienti, anche per molto tempo, dal sistema immunitario, ma il tumore non viene eliminato. L'ultima fase è quella della fuga del tumore dall'immunosorveglianza, in cui il tumore diventa clinicamente evidente ed eventualmente si diffonde agli altri organi. La fase di fuga si verifica perché il tumore, grazie alla sua instabilità genetica, sviluppa delle strategie di resistenza all'attacco delle cellule immunitarie, rendendo inefficace l'induzione della risposta antitumorale e limitando il riconoscimento delle cellule tumorali da parte del sistema immunitario. Inoltre, anche la creazione di un TME immunosoppressivo, attraverso i suoi componenti cellulari e umorali, contribuisce alla fase di fuga. Sia le cellule tumorali sia le cellule con funzione immunosoppressiva che infiltrano il TME, come le cellule immature mieloidi (MDSC), le cellule T regolatorie (Treg) e i macrofagi di tipo 2, producono e rilasciano mediatori in grado di inibire la risposta immunitaria, come il TGF- β e IL-10 [33].

L'immunoterapia nasce con l'obiettivo di rinvigorire la preesistente risposta immunitaria antitumorale. La comprensione dell'infiltrato immunitario presente nel TME diventa quindi fondamentale per individuare potenziali target dell'immunoterapia e sviluppare nuove strategie terapeutiche [34]. Uno dei principali bersagli dell'immunoterapia sono i recettori definiti immuno-checkpoint che, in condizioni fisiologiche, impediscono alle cellule effettrici del sistema immunitario di prendere di mira le cellule *self* per prevenire l'autoimmunità. Questo meccanismo di regolazione viene sfruttato dalle cellule tumorali per sopprimere l'attività del sistema immunitario e sfuggire all'immunosorveglianza. Due delle proteine checkpoint più studiate sono la *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (CTLA-4) e la *Programmed cell death protein 1* (PD-1). Gli inibitori del checkpoint immunitario

(ICI), come gli anticorpi monoclonali anti-PD-1 o anti-PD-L1, hanno migliorato la sopravvivenza in diversi tipi di tumori, incluso il carcinoma gastrico [35]. PD-1 è una proteina che fa parte della famiglia CD28 ed è espressa da vari tipi di cellule immunitarie del TME, tra cui monociti attivati, cellule dendritiche (DC), piccole frazioni di cellule NK, cellule T e cellule B. I ligandi di PD-1 sono PD-L1 e PD-L2, che fanno parte della famiglia delle molecole B7. Le cellule tumorali e altre cellule nel TME possono esprimere alti livelli di PD-L1, con il quale riescono a sopprimere l'immunità antitumorale. Infatti, l'interazione di PD-L1 con PD-1 è in grado di indurre l'apoptosi, l'anergia e l'esaurimento funzionale delle cellule T attivate e di stimolare la produzione di IL-10, che media a sua volta una soppressione immunitaria. PD-L1 può anche mediare la soppressione delle DC e indurre la differenziazione delle cellule Treg [36].

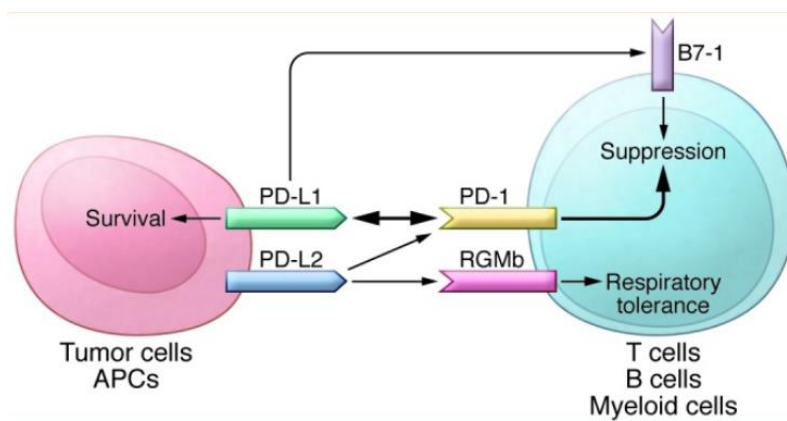


Figura 5. La via del PD-1. Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. J Clin Invest. 2015

Lo studio che ha aperto l'interesse all'uso degli ICI nel tumore gastrico è stato KEYNOTE-012, uno studio di fase Ib che ha utilizzato l'anticorpo anti-PD-1 Pembrolizumab in pazienti pretrattati con espressione di PD-L1 $\geq 1\%$ sulle cellule tumorali [37]. Nel settembre 2017, grazie ai risultati dello studio KEYNOTE-059 [NCT02335411], Pembrolizumab ha ottenuto l'approvazione dalla FDA per il trattamento del carcinoma gastrico avanzato con espressione di PD-L1. Due studi successivi di fase III, KEYNOTE-062 e CHECKMATE-649, hanno valutato l'associazione dell'immunoterapia con la chemioterapia in I linea. KEYNOTE-062 è uno studio a tre bracci che confronta Pembrolizumab in monoterapia vs Pembrolizumab in combinazione con la chemioterapia (cisplatino + 5-FU) vs chemioterapia, come terapia di prima linea nel carcinoma gastrico avanzato e della GEJ. Pembrolizumab, in monoterapia o associato alla chemioterapia, si è mostrato non inferiore alla chemioterapia nei pazienti con PD-L1 $\geq 1\%$, mentre nei pazienti con PD-L1 $\geq 10\%$ si è evidenziato un miglioramento della sopravvivenza a favore del Pembrolizumab [38]. Lo studio CHECKMATE-649 ha

valutato l'aggiunta dell'anticorpo anti-PD-1 Nivolumab alla chemioterapia (5FU-leucovorin-oxaliplatino) nel trattamento in prima linea del carcinoma gastrico avanzato e della GEJ. I risultati hanno mostrato un miglioramento significativo della sopravvivenza rispetto alla sola chemioterapia nei pazienti con PD-L1 $\geq 5\%$ [39]. Nel 2022 AIFA ha approvato la rimborsabilità del Nivolumab in associazione a chemioterapia di combinazione a base di fluoropirimidina e platino per il trattamento in prima linea di pazienti adulti con adenocarcinoma dello stomaco o della GEJ, HER2 negativo, avanzato o metastatico, i cui tumori esprimano PD-L1 con un punteggio positivo combinato (CPS) ≥ 5 .

L'efficacia clinica degli ICI dipende dall'infiltrazione a livello del tessuto tumorale di cellule T in grado di uccidere le cellule neoplastiche. Si possono distinguere tre profili principali di TME in base all'infiltrato immunitario: (1) fenotipo immuno-infiammato, che corrisponde al TME "caldo", caratterizzato da un'elevata infiltrazione di cellule T, dall'aumento della segnalazione di interferone γ (IFN- γ), dall'espressione di PD-L1 e da un elevato carico mutazionale tumorale; (2) fenotipo immuno-escluso, in cui i linfociti T si localizzano nello stroma che circonda i nidi tumorali in quanto non sono in grado di infiltrare efficacemente il tumore; (3) fenotipo immuno-desertico, in cui i linfociti T sono assenti sia dal tumore che dalla sua periferia. I tumori immuno-esclusi e quelli immuno-desertici corrispondono al TME "freddo", caratterizzato da una scarsa o assente infiltrazione di linfociti T, da una bassa espressione di HLA di classe I, da una scarsa espressione di PD-L1 e da un ridotto carico mutazionale. I tumori con un fenotipo "caldo" tendono ad essere più responsivi agli ICI [40].

Kim TS et al. hanno analizzato il TME dei carcinomi gastrici seguendo la classificazione molecolare del progetto TCGA, evidenziando come il carcinoma gastrico generi una risposta immunitaria eterogenea, che rispecchia l'eterogeneità molecolare del tumore stesso. In particolare, il carcinoma gastrico di tipo intestinale (che rappresenta il sottotipo con instabilità cromosomica) e quello di tipo diffuso (che rappresenta il sottotipo genomicamente stabile) si sono dimostrati poveri di infiltrato immunitario (tumori "freddi"). Invece, il sottotipo con MSI e quello EBV-positivo hanno mostrato l'infiltrato immunitario più abbondante (tumori "caldi") e la più alta espressione di PD-L1, il che li renderebbe più suscettibili alla combinazione della chemioterapia con ICI [41]. Lo studio DANTE, presentato all'ESMO 2021, ha confrontato la regressione patologica del tumore nei pazienti MSI-*high* trattati con una combinazione di Atezolizumab (anti-PD-L1) con FLOT rispetto al solo FLOT. I risultati hanno mostrato un beneficio nell'uso della combinazione di ICI + chemioterapia nei pazienti MSI-*high* [42].

Nonostante il ruolo importante che gli ICI hanno assunto nell'immunoterapia, la maggior parte dei pazienti con carcinoma gastrico avanzato non ha un beneficio clinico soddisfacente a causa dell'inefficacia del trattamento o della resistenza del tumore agli ICI stessi. Una delle principali sfide nel trattamento del carcinoma gastrico è il superamento della resistenza agli ICI, i cui meccanismi rimangono in gran parte sconosciuti. Una possibile strategia consiste nell'associazione di ICI con altre terapie, come altri agenti immunomodulanti, radioterapia o chemioterapia, per cercare di migliorare la risposta all'immunoterapia. Alcuni studi hanno scoperto che diversi agenti chemioterapici, come la doxorubicina, il mitoxantrone, l'epirubicina, l'idarubicina, l'oxaliplatino e la ciclofosfamide, possono stimolare l'immunità antitumorale inducendo la morte cellulare immunogenica delle cellule tumorali. Questo suggerisce che la chemioterapia immunogenica potrebbe migliorare l'efficacia dell'immunoterapia [43]. Tuttavia, negli attuali schemi terapeutici la maggior parte dei chemioterapici viene adoperato a dosaggi immunosoppressivi e nei regimi chemio-immunoterapici si ricorre a dosi e schemi non sono ancora ottimali per attivare le risposte immunitarie antitumorali [44]. Lo sviluppo di terapie combinate richiede ancora un'ampia ricerca traslazionale per poter arrivare alla conoscenza dei meccanismi alla base della modulazione immunitaria e della resistenza all'immunoterapia [43].

Un'altra strategia consiste nello sviluppare nuovi modulatori del checkpoint immunitario con una migliore efficacia. Negli ultimi anni sono emersi nuovi immuno-checkpoint, tra cui TIGIT (*T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains*), un recettore inibitorio espresso dalle cellule NK, dai linfociti T, dai linfociti B e dalle cellule Treg. TIGIT condivide lo stesso ligando (CD155) con il recettore co-stimolatorio CD226 (chiamato anche DNAM-1), espresso anch'esso dalle cellule NK e dai linfociti T. Di conseguenza, TIGIT e DNAM-1 competono per legare CD155. Le cellule tumorali possono esprimere il CD155 che, interagendo con TIGIT, induce uno stato di ridotta responsività dei linfociti, favorendo la sopravvivenza delle cellule tumorali dall'attacco del sistema immunitario. Anche le cellule Treg TIGIT⁺ che infiltrano il tessuto tumorale possono guidare un fenotipo disfunzionale nelle cellule T effettrici attraverso la produzione di IL-10 [45]. TIGIT espresso sulle cellule B memoria contribuisce a limitare le risposte pro-infiammatorie Th1 e Th17, sopprimendo la maturazione delle DC. Le cellule B della memoria TIGIT⁺ sopprimono infatti l'espressione di CCR7, che è fondamentale per la migrazione delle DC ai linfonodi per avviare le risposte immunitarie [46].

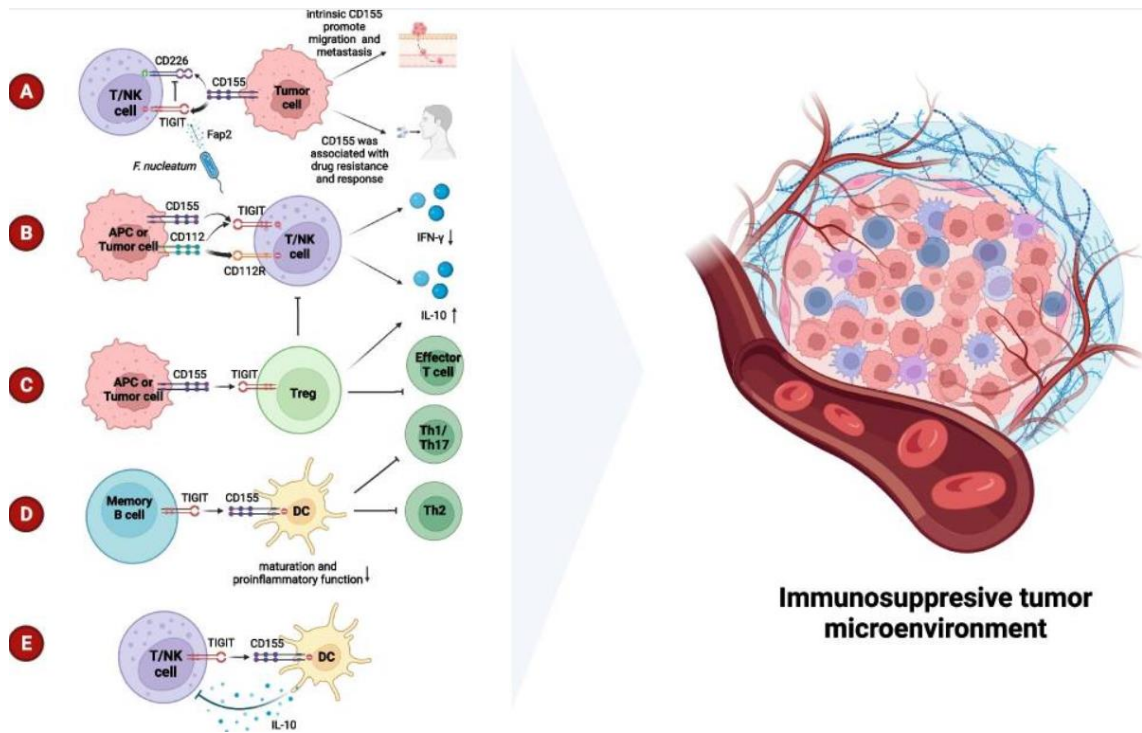


Figura 6. Meccanismi di immunosoppressione di TIGIT nel TME. Zhang P, Liu X, Gu Z, et al. Targeting TIGIT for cancer immunotherapy: recent advances and future directions. *Biomark Res.* 2024.

Nel tumore gastrico è stata osservata un'espressione significativamente aumentata di TIGIT sulle cellule T effettrici e di CD155 sulle cellule del tumore [47]. L'elevata espressione di TIGIT e CD155 nel tessuto del carcinoma gastrico è associato ad una prognosi infausta [48]. Inoltre, nel tumore gastrico l'espressione di TIGIT è associata con l'espressione di PD-1: diversi studi su tumori solidi suggeriscono il potenziale di efficacia del doppio blocco di TIGIT e PD-1 come terapia antitumorale. He et al. hanno riscontrato che il blocco combinato di TIGIT e PD-1 aumenta la produzione di IFN- γ da parte dei linfociti T CD8⁺ in co-coltura con cellule di tumore gastrico [47]. Pertanto, l'inibizione combinata di TIGIT e PD-1 potrebbe essere una potenziale opzione terapeutica anche nel tumore gastrico. Attualmente, la co-inibizione di TIGIT e PD-1 è in fase di valutazione in studi clinici su un'ampia gamma di tumori solidi, tra cui anche il carcinoma gastrico [49]. Uno di questi è lo studio di fase III STAR-221 [NCT05568095], che confronta la combinazione dell'anticorpo monoclonale anti-TIGIT Domvanalimab, dell'anticorpo monoclonale anti-PD-1 Zimberelimab e della chemioterapia rispetto all'anticorpo monoclonale anti-PD-1 Nivolumab + chemioterapia, nel trattamento di prima linea delle forme localmente avanzate o metastatiche di carcinoma gastrico, della GEJ e dell'adenocarcinoma esofageo. Recentemente, lo studio di fase II EDGE-Gastric [NCT05329766], che valuta l'aggiunta della combinazione tra Domvanalimab e Zimberelimab alla chemioterapia FOLFOX, ha mostrato dei risultati incoraggianti in termini di risposta globale e sopravvivenza libera da progressione di malattia a 6 mesi.

1.7.1. Tessuto linfoide terziario

Le strutture linfoidi terziarie (TLS) sono strutture linfoidi ectopiche in siti tissutali non linfoidi, indotti da un'intensa attivazione locale delle risposte immunitarie cellulari e umorali, che può verificarsi durante un processo infiammatorio cronico o in una patologia tumorale. Le TLS sono strutture linfoidi simili agli organi linfoidi secondari (linfonodi, placche di Peyer e milza), caratterizzate da zone a cellule B, zone a cellule T e vasi specializzati noti come venule ad endotelio alto (HEV), sebbene le TLS non siano incapsulate né fornite di vasi linfatici. Le aree a cellule B ricordano i follicoli a cellule B dei linfonodi, composti da un mantello di cellule B naïve che circonda un centro germinativo [50]. Il centro germinativo è una struttura micro-anatomica transitoria che si forma dall'interazione delle cellule T helper follicolari (Tfh) con le cellule B. Le cellule Tfh all'interno dei centri germinativi (GC-Tfh) esprimono alti livelli di TIGIT, il quale compete con CD226 per il legame con il loro ligando CD155. I segnali di CD226 promuovono la fase iniziale della differenziazione delle cellule Tfh, mentre l'importanza dei segnali di CD226 diminuisce nelle cellule GC-Tfh mature. L'elevata espressione di TIGIT su GC-Tfh può svolgere un ruolo nell'attenuazione dei segnali dannosi di CD226 dopo la maturazione delle cellule GC-Tfh [51]. All'interno del centro germinativo si verifica l'espansione clonale e la maturazione per affinità delle cellule B. Oltre alle cellule Tfh, altri sottogruppi di cellule T nelle TLS includono le cellule T CD8, le cellule CD4 Th1 e le cellule Treg FOXP3⁺ [52].

La maggior parte delle TLS nei tessuti tumorali si sviluppa nelle aree peritumorali, appena fuori dal tessuto tumorale o nella periferia del tumore. Infatti, nei tessuti che circondano il tumore si verificano continue risposte immunitarie a causa della ripetuta presentazione di antigeni estranei da parte delle cellule tumorali, favorendo la formazione delle TLS [50].

Sempre più evidenze dimostrano che le TLS svolgono un ruolo importante nel controllo dell'invasione tumorale. Come le strutture linfoidi secondarie, le TLS possono costituire un sito critico in cui specifiche cellule T e B possono subire la differenziazione terminale in cellule effettrici ed esercitare i loro effetti antitumorali. Il valore prognostico delle strutture TLS è stato descritto per diversi tumori solidi, incluso il tumore dello stomaco. Hennequin et al. nel loro studio hanno osservato che la presenza di strutture linfoidi B CD20⁺ peritumorali era associata a una migliore prognosi in termini di sopravvivenza libera da recidiva. Tali strutture possono essere considerate come TLS a causa della loro organizzazione strutturale molto simile agli organi linfoidi secondari [53].

Tuttavia, alcuni studi condotti sul tumore del colon-retto e sul tumore della mammella hanno indicato che le TLS possono avere anche un impatto negativo sulla prognosi, associandosi a forme di malattia più avanzata [54]. Joshi et al. suggeriscono che le TLS possono svolgere sia funzioni pro-tumorali che antitumorali a seconda dello stato di progressione della malattia e della presenza di cellule immunosoppressive, comprese le cellule Treg [55]. Diversi studi hanno infatti sottolineato il ruolo negativo delle cellule Treg sulla capacità delle TLS di generare linfociti effettori e di memoria [54].

1.7.2. Potenziale terapeutico delle cellule NK nel carcinoma gastrico

Le cellule Natural Killer (NK) appartengono alla famiglia dei linfociti dell'immunità innata (ILC) e svolgono un importante ruolo di controllo nei confronti di cellule tumorali o infettate da virus. Grazie all'espressione di recettori per le chemochine, hanno la capacità di migrare nei tessuti infiammati e negli organi linfoidi secondari, dove contribuiscono in prima linea alla difesa contro i patogeni, svolgendo attività citotossica nei confronti delle cellule malate o rilasciando chemochine e citochine (quali $\text{INF-}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$). Inoltre, tramite l'interazione con le DC, favoriscono l'attivazione di linfociti T. Le cellule NK sono il 5-10% dei linfociti nel sangue periferico (PB) e hanno origine dal midollo osseo da cellule staminali ematopoietiche (HSCs) CD34^+ . Durante il processo di maturazione delle cellule NK la densità di espressione del CD56 cambia. Infatti, le cellule CD34 danno prima origine a cellule NK $\text{CD56}^{\text{bright}}$ e successivamente a cellule NK CD56^{dim} che acquisiscono anche l'espressione di CD16. Pertanto, nel PB le cellule NK si distinguono in due famiglie principali: $\text{CD56}^{\text{bright}} \text{CD16}^-$ (10%) aventi funzione regolatoria e $\text{CD56}^{\text{dim}} \text{CD16}^+$ terminalmente differenziate (90%) aventi soprattutto una funzione citotossica. Nei tessuti, invece, prevale la popolazione $\text{CD56}^{\text{bright}} \text{CD16}^-$, mentre le $\text{CD56}^{\text{dim}} \text{CD16}^+$ vi migrano solo in corso di risposta infiammatoria.

In realtà, le cellule NK possono essere suddivise in un maggior numero di sottopopolazioni anche in base all'espressione di alcuni marcatori come i recettori per le chemochine (più frequenti sulle cellule $\text{CD56}^{\text{bright}}$) e il CD57. Quest'ultima molecola contraddistingue popolazioni di $\text{CD56}^{\text{dim}} \text{CD16}^+$ che siano già andate incontro ad attivazione funzionale e che definiamo "adaptive": queste cellule si espandono in genere in seguito alla continua stimolazione durante infezioni da herpesvirus come CMV: l'espressione di CD57 segna l'acquisizione di una maggiore capacità citotossica, che si

manifesta in seguito ad ulteriore esposizione a cellule infettate da virus (quali il CMV), un comportamento che può presentare quindi delle affinità con i linfociti T memoria.

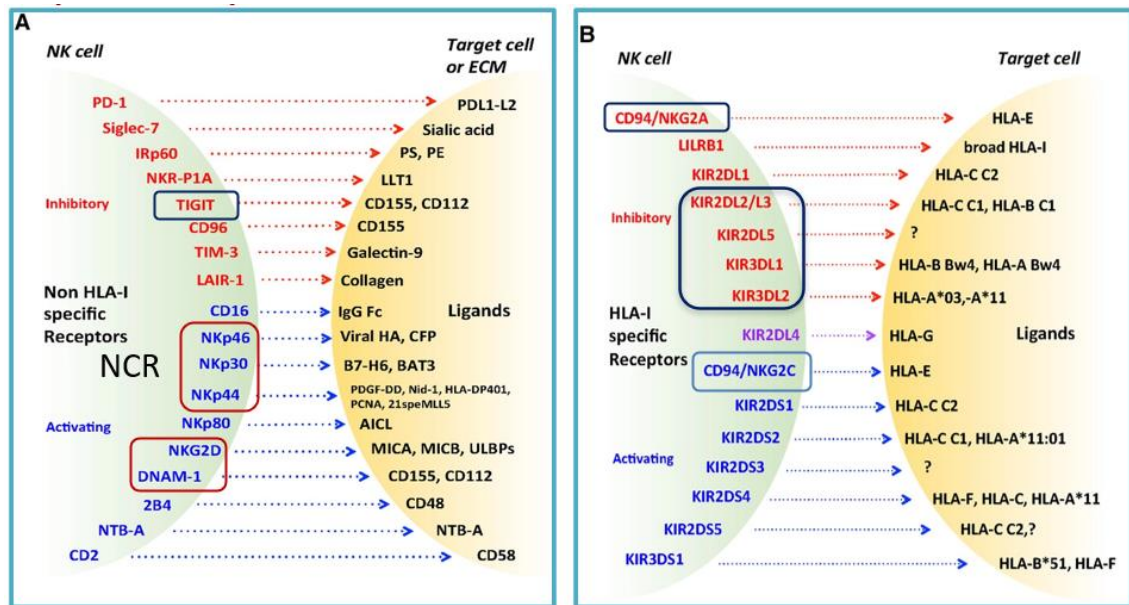


Figura 7. Recettori attivatori e inibitori delle cellule NK e loro ligandi. (A) Non-HLA-I specific receptors; (B) HLA-I specific receptors. Quatrini, Linda et al. "Human NK cells, their receptors and function." European journal of immunology vol. 51,7 (2021): 1566-1579.

Le cellule NK sono regolate nelle loro funzioni da recettori inibitori ed attivatori. I principali recettori inibitori sono i *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors* (KIR) che riconoscono le molecole MHC di classe I altamente polimorfiche (HLA-I, alleli A, B e C), espresse da tutte le nostre cellule nucleate. Un altro importante recettore inibitorio è l'eterodimero CD94/NKG2A, appartenente alla famiglia delle proteine C-lectino-simili, che riconosce molecole HLA-E, appartenenti a un gruppo di proteine HLA-I non classiche, con polimorfismo limitato. È da sottolineare che anche l'espressione differenziale di questi recettori inibitori correla con la presenza di diverse sottopopolazioni NK: in particolare le CD56^{bright} CD16⁻ esprimono il recettore CD94/NKG2A mentre le CD56^{dim} CD16⁺ esprimono soprattutto i KIR.

I principali recettori attivatori sono: CD16, i recettori di citotossicità naturale NKp46, NKp44 e NKp30 (NCR) e DNAM-1, tutti appartenenti alla famiglia delle immunoglobuline, mentre NKG2D appartiene alle molecole C-lectino-simili. Anche l'analisi degli NCR può portare a distinguere diverse sottopopolazioni NK. In particolare, l'espressione di NKp46 è più evidente sulle popolazioni CD56^{bright}CD16⁻ mentre le cellule CD56^{dim}CD16⁺CD57⁺ possono avere un'espressione ridotta di questo marcatore. Il CD16, infine, è il recettore responsabile del meccanismo di citotossicità cellulare dipendente da anticorpi (ADCC), che è appunto mediata dalle cellule NK CD16⁺ [56].

Le cellule NK svolgono un ruolo importante nell'immunità antitumorale. Possono attaccare le cellule tumorali inducendone l'apoptosi attraverso diversi meccanismi: il principale è quello rappresentato dal rilascio di perforina e granzimi in seguito alla formazione della sinapsi immunologica tra la cellula NK e la cellula bersaglio, mediata dall'interazione dei recettori attivatori NCR con gli appropriati ligandi o dalla reazione di ADCC (*Antibody-Cell-Dependent-Cytotoxicity*) mediata dalla molecola CD16, espressa dalle cellule NK CD56^{dim}. Un ulteriore meccanismo è quello mediato dalla formazione di complessi FAS/FASL e TRAIL/TRAIL-R. Inoltre, le cellule NK possono produrre citochine, come IFN- γ e TNF- α , che potenziano la risposta antitumorale e l'infiammazione [57]. È stato suggerito che le cellule NK siano in grado di riconoscere ed eliminare le cellule staminali del cancro (CSCs), ovvero cellule originate da un meccanismo di transizione epitelio-mesenchimale che svolgono un ruolo chiave nella crescita, nella metastatizzazione e nella recidiva del tumore [58] [59].

Tuttavia, la funzione delle cellule NK è alterata nei pazienti affetti da diversi tipi di tumore incluso il carcinoma gastrico. Chen J. et al. hanno osservato che le cellule NK del PB di pazienti con carcinoma gastrico hanno una grave compromissione della capacità di produrre IFN- γ dopo stimolazione e i livelli di TNF- α , IL-2, e IL-15R β sono diminuiti nel tessuto tumorale gastrico e nel PB. La diminuzione dei livelli di queste citochine conferma la riduzione della funzione delle cellule NK nei pazienti con carcinoma gastrico [60].

Diversi studi (Langers I, et al., 2012; Mamessier E, et al., 2011; Platonova S, et al., 2011) hanno dimostrato che la funzione delle cellule NK è influenzata negativamente dal TME a causa di diversi meccanismi di evasione immunitaria messi in atto dal tumore. Le cellule tumorali possono alterare l'espressione dei recettori attivatori e inibitori sulle cellule NK, facendo in modo che quelli attivatori risultino meno espressi o meno attivi a causa della perdita dei loro ligandi. Ad esempio, le cellule del carcinoma gastrico riducono l'espressione sulla membrana plasmatica di MICA e MICB, ligandi di NKG2D, rilasciandoli in forma solubile [61]. Il recettore NKG2D potrebbe svolgere un ruolo importante nell'attivazione delle cellule NK contro le cellule tumorali: infatti, i pazienti con un tumore gastrico infiltrato da cellule NK che esprimono il recettore NKG2D hanno un vantaggio in termini di OS rispetto ai pazienti con NK prive dell'espressione di NKG2D nel tumore [62].

Le cellule tumorali, inoltre, possono rilasciare citochine in grado di alterare la funzione delle cellule NK [57]. Ad esempio, le cellule tumorali producono prostaglandina E2 che svolge un effetto inibitorio sulla proliferazione delle cellule NK e ne induce l'apoptosi in

vitro [63]. Inoltre, lo sviluppo del carcinoma gastrico è accompagnato da un aumento dei livelli sierici di IL-10 e TGF- β 1, che si traducono in una notevole diminuzione dell'attività citotossica delle cellule NK [64].

Un altro meccanismo di fuga dall'immunosorveglianza NK-mediata consiste nel richiamare nel TME delle cellule immunoregolatorie, come le Treg e i macrofagi, che svolgono un ruolo di soppressione immunitaria nel carcinoma gastrico [57]. Recenti evidenze, infatti, suggeriscono che le cellule Treg e i macrofagi associati al tumore esercitano le loro proprietà immunomodulatorie attraverso un'elevata e stabile espressione della citochina TGF- β 1 [65] [66]. Tale citochina ha effettivamente dimostrato in vitro di indurre una modulazione negativa dell'espressione di NKp30, NKp46, NKG2D e DNAM-1, recettori attivatori delle cellule NK [67].

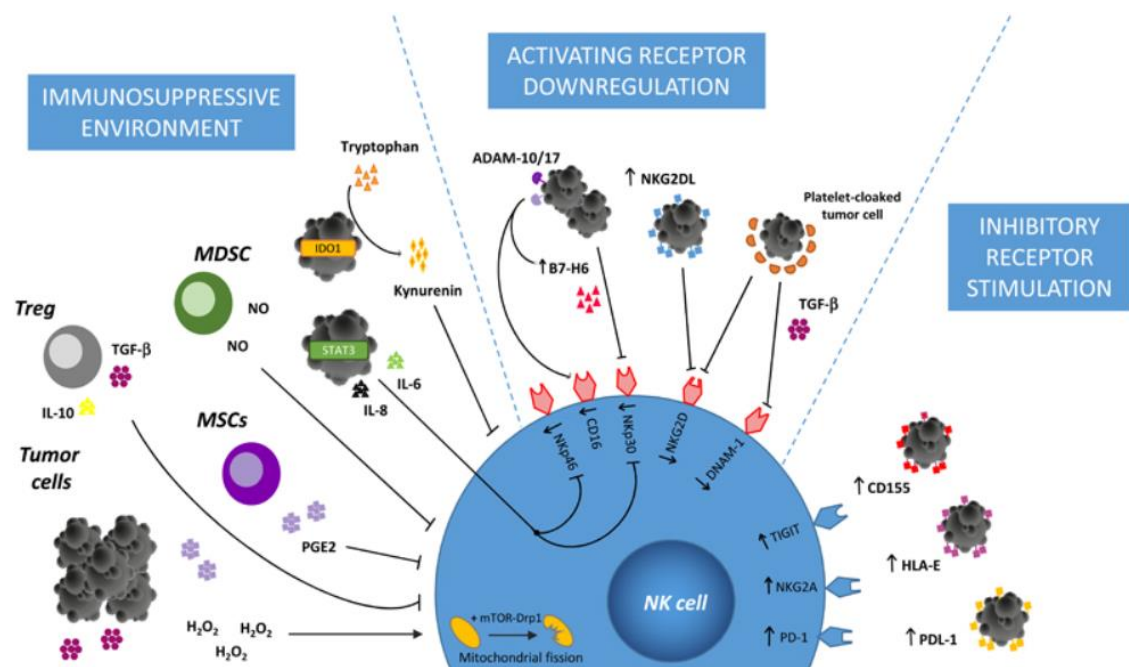


Figura 8. Meccanismi coinvolti nella disfunzione delle cellule NK nel tessuto tumorale. Cózár, Beatriz et al. "Tumor-Infiltrating Natural Killer Cells." Cancer discovery vol. 11,1 (2021): 34-44.

La percentuale di cellule NK è significativamente ridotta nei tumori rispetto ai tessuti non tumorali. Ciò può essere una conseguenza di una minore capacità delle cellule NK di migrare nel tessuto tumorale dal PB o di una maggiore apoptosi delle cellule NK che si infiltrano nei tumori [65]. Diversi studi (Platonova, S. et al., 2011; Carrega, P. et al., 2008) hanno osservato una predominanza di cellule NK CD56^{bright}CD16⁻ e una riduzione di cellule NK CD56^{dim}CD16⁺ nel tessuto tumorale rispetto al tessuto sano corrispondente. La predominanza di questo *subset* meno citotossico di cellule NK nei tumori sembrerebbe derivare da meccanismi di regolazione della migrazione nel TME che coinvolge interazioni tra chemochine e i rispettivi recettori. In particolare, CXCR3 è espresso soprattutto dalle cellule NK CD56^{bright}CD16⁻ ed è implicato nell'homing in diversi tumori

solidi attraverso l'interazione con CXCL10 [68]. Inoltre, le cellule NK CD56^{dim}CD16⁺ sono più sensibili all'apoptosi indotta da H₂O₂ rispetto alle cellule NK CD56^{bright}CD16⁻: questo potrebbe essere rilevante visto che l'H₂O₂ è risultato abbondantemente prodotto all'interno dei microambienti tumorali [69]. La riduzione delle cellule NK CD56^{dim}CD16⁺ osservato nella maggior parte dei tumori solidi rappresenta quindi un potenziale meccanismo messo in atto dal tumore per sfuggire all'immunosorveglianza delle cellule NK. Anche nel carcinoma gastrico si osserva una diminuzione graduale della percentuale di cellule NK CD56^{dim}CD16⁺ con la progressione del tumore, che correla con una riduzione dell'OS [65] [70].

Il ruolo importante delle cellule NK nell'immunità antitumorale ha alimentato un crescente interesse nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche per aumentare l'infiltrazione e la funzione delle cellule NK nel TME.

Le citochine IL-2, IL-12, IL-18 e IL-15 sono state identificate come fattori chiave nella sovra-regolazione delle cellule NK. La prima citochina che è stata utilizzata per migliorare l'attività antitumorale delle cellule NK è stata IL-2. Tuttavia, il suo utilizzo ha mostrato fin da subito alcuni problemi: le alte dosi di IL-2 necessarie per indurre un'efficiente espansione in vivo delle cellule NK e un'efficace attività antitumorale potevano indurre gravi reazioni avverse. Inoltre, IL-2 agisce anche sulle cellule Treg, inducendo la produzione di TGF- β e di conseguenza immunosoppressione. Questo problema non sussiste nell'uso di IL-15, una citochina dal noto ruolo nell'attivazione delle cellule NK senza stimolare le cellule Treg [56]. Sebbene sia stato dimostrato il potenziale dell'IL-15 nel guidare l'uccisione dei tumori solidi da parte delle cellule NK, uno studio evidenzia come l'utilizzo cronico di IL-15 porti ad un esaurimento funzionale delle cellule NK [71].

Analogamente alle cellule T, anche le cellule NK possono essere bersaglio degli ICI, grazie all'espressione di recettori inibitori che funzionano da checkpoint immunitari, inclusi i recettori HLA-specifici (KIR e NKG2A) e quelli non HLA-specifici come PD-1, TIGIT, CD96, TIM-3 [72]. Per questo motivo, l'utilizzo degli ICI potrebbe diventare una possibile strategia per migliorare l'infiltrazione tumorale e la citotossicità delle cellule NK contro il tumore gastrico.

Il checkpoint immunitario PD-1 può essere espresso sulle cellule NK periferiche e infiltranti di pazienti con tumori digestivi, tra cui il carcinoma gastrico, e si associa ad una sopravvivenza più scarsa. Il blocco della segnalazione PD-1/PD-L1 migliora notevolmente la produzione e la degranolazione delle citochine e sopprime l'apoptosi delle cellule NK in vitro [73]. Abdolahi S. et al. hanno valutato l'uso del Nivolumab (anti-

PD-1) per migliorare l'efficacia della terapia con cellule NK espansive ex vivo e attivate da IL-2. Lo studio è stato condotto in vitro su modelli murini di tumore gastrico e ha dato risultati promettenti, mostrando come l'approccio combinato promuova l'inibizione della crescita tumorale e l'infiltrazione di cellule immunitarie nel modello tumorale. Pertanto, il passo successivo sarà quello di valutare l'efficacia di questa strategia di combinazione in studi clinici randomizzati [74].

L'anticorpo monoclonale anti-NKG2A (Monalizumab) si è dimostrato in grado di stimolare l'attività antitumorale delle cellule T e delle cellule NK. Pertanto, Monalizumab è stato proposto come nuovo inibitore del checkpoint immunitario per il trattamento di diversi tumori solidi, tra cui il carcinoma gastrico, che esprimono HLA-E, ovvero il ligando di NKG2A. Tuttavia, attualmente non ci sono studi a riguardo sul carcinoma gastrico [75].

TIM-3 è espresso dai linfociti T e dalle cellule NK. È dimostrato che l'espressione di TIM-3 nelle cellule NK dei pazienti con carcinoma gastrico è maggiore rispetto ai controlli sani e gli alti livelli di TIM-3 si associano ad uno stadio avanzato del tumore [76]. Tuttavia, l'uso di terapie mirate al blocco di TIM-3 per ripristinare l'immunità antitumorale è controverso a causa di studi che hanno evidenziato una funzione stimolatoria di TIM-3 nel promuovere la differenziazione e l'attivazione delle cellule T [77].

La sovra-espressione di TIGIT è correlata all'immunosoppressione delle cellule T e delle cellule NK. Il blocco di TIGIT ha infatti mostrato la capacità di impedire l'esaurimento delle cellule NK infiltranti il tumore e di promuovere l'immunità antitumorale NK-mediata in diversi modelli tumorali murini. La terapia anti-TIGIT potrebbe quindi rappresentare un'opzione di trattamento per i pazienti oncologici. Un recente studio condotto da Hasan MF et al. [78] è stato proprio progettato con l'obiettivo di fornire una comprensione maggiore riguardo la funzione di TIGIT sulle cellule NK umane attivate. Lo studio è stato condotto utilizzando sferoidi di cancro del polmone che esprimono CD155. In questo studio è stato riscontrato che TIGIT è altamente espresso sulle cellule NK attivate e infiltranti il tumore e a livelli più bassi sulle cellule NK non attivate a riposo. Inoltre, le cellule NK TIGIT⁺ hanno mostrato una migliore funzione citotossica dopo l'esposizione al bersaglio tumorale. TIGIT può essere considerato come marcatore di attivazione delle cellule NK. Tuttavia, in fase di cronicizzazione della risposta immunitaria, la sua aumentata espressione e conseguente interazione con i propri ligandi sulle cellule tumorali, correla con il declino funzionale delle cellule NK. Ne consegue che l'uso di anticorpi anti-TIGIT può aiutare a prevenire l'esaurimento funzionale delle

cellule NK, ma nello stesso tempo il blocco di TIGIT può influenzare negativamente l'efficacia del trattamento a causa dell'inibizione della popolazione di cellule NK attivate.

1.8. Citometria di massa

La citofluorimetria è stata una tecnologia fondamentale per gli studi di immunologia, dimostrandosi uno strumento potente nel fornire informazioni biologiche critiche a livello della singola cellula, anche per quanto riguarda la caratterizzazione del TME. Questa tecnica, infatti, consente di riconoscere singole sottopopolazioni cellulari in base all'espressione di marcatori di superficie, per individuare i quali si serve di specifici anticorpi coniugati con sonde fluorescenti, detti fluorocromi, che sono molecole che possono essere eccitate da un laser a una specifica lunghezza d'onda emettendo così luce di energia inferiore con una lunghezza d'onda maggiore. Ogni fluorocromo possiede uno specifico profilo di eccitazione e di emissione. Tuttavia, l'uso di sonde fluorescenti per marcare gli anticorpi può presentare delle difficoltà a mano a mano che si aumenta il numero di marcatori da identificare contemporaneamente su una stessa cellula. Infatti, si possono verificare il fenomeno della sovrapposizione spettrale delle lunghezze d'onda a cui emettono i vari fluorocromi e il fenomeno dell'auto-fluorescenza cellulare, rendendo necessario la limitazione del numero di marcatori analizzabili simultaneamente e l'applicazione di correzioni [79]. Inoltre, con la citofluorimetria tradizionale, una volta preparati i campioni, l'analisi deve essere svolta in tempi relativamente brevi e questo può rappresentare un problema di fronte a protocolli di screening prolungati nel tempo e con alti numeri di campioni.

L'avvento della citometria di massa, una nuova tecnologia di analisi a singola cellula che nasce dalla fusione della citometria a flusso con la spettrometria di massa, potrebbe risolvere almeno in parte queste problematiche. Essa, infatti, sostituisce i fluorocromi con isotopi metallici, ciascuno dei quali possiede uno specifico peso atomico. Questo permette di eliminare il problema della sovrapposizione spettrale, consentendo di analizzare contemporaneamente molti più parametri rispetto alla citofluorimetria, pur mantenendo un'alta definizione e affidabilità. Questo significa anche che si possono analizzare in un singolo campione un alto numero di marcatori, rispetto alla citofluorimetria che, con lo stesso numero di marcatori, richiederebbe un'analisi distribuita su diversi campioni invece che su uno singolo. Inoltre, una volta preparati i campioni, questi possono essere congelati per lungo tempo, permettendo una più facile organizzazione delle tempistiche di analisi. Nonostante questo, l'uso della citometria di

massa è ancora limitato sia per i costi iniziali della strumentazione sia per la necessità di avere personale preparato ad applicare questo tipo di tecnica.

Nella citometria di massa, le cellule vengono incubate con una miscela di sonde/anticorpi marcati con un isotopo unico di metalli pesanti non radioattivi. Le cellule vengono nebulizzate in modo tale che ogni gocciolina contenga una singola cellula, per poter essere introdotte nel citometro di massa. Entrate nello strumento, le cellule viaggiano attraverso un plasma di Argon che, rompendo i legami covalenti, atomizza e ionizza ogni cellula, scomponendola in una nube ionica. Gli ioni vengono tutti caricati positivamente prima di passare attraverso un filtro a quadrupolo che seleziona gli ioni in base alla massa con una soglia di 75Da: gli ioni al di sotto di questa soglia, vengono scartati. Gli ioni scartati rappresentano gli elementi biologici comuni. In questo modo la nube ionica viene a contenere solo gli ioni corrispondenti ai tag metallici coniugati agli anticorpi che sono stati utilizzati. La nube ionica può così entrare nell'analizzatore a tempo di volo (time-of-flight o TOF), in cui ogni ione viene accelerato per viaggiare attraverso un tubo di volo di lunghezza nota e raggiungere il rivelatore, generando dei segnali elettrici convertiti in una matrice di dati. Il tempo necessario agli ioni per muoversi attraverso il tubo di volo tra la sorgente ionica e il rivelatore dipende dalla loro massa: più la massa è grande, più gli ioni viaggeranno lentamente e arriveranno al rivelatore in un tempo maggiore, mentre ioni con massa più piccola viaggeranno più velocemente e arriveranno prima al rivelatore [79] [80].

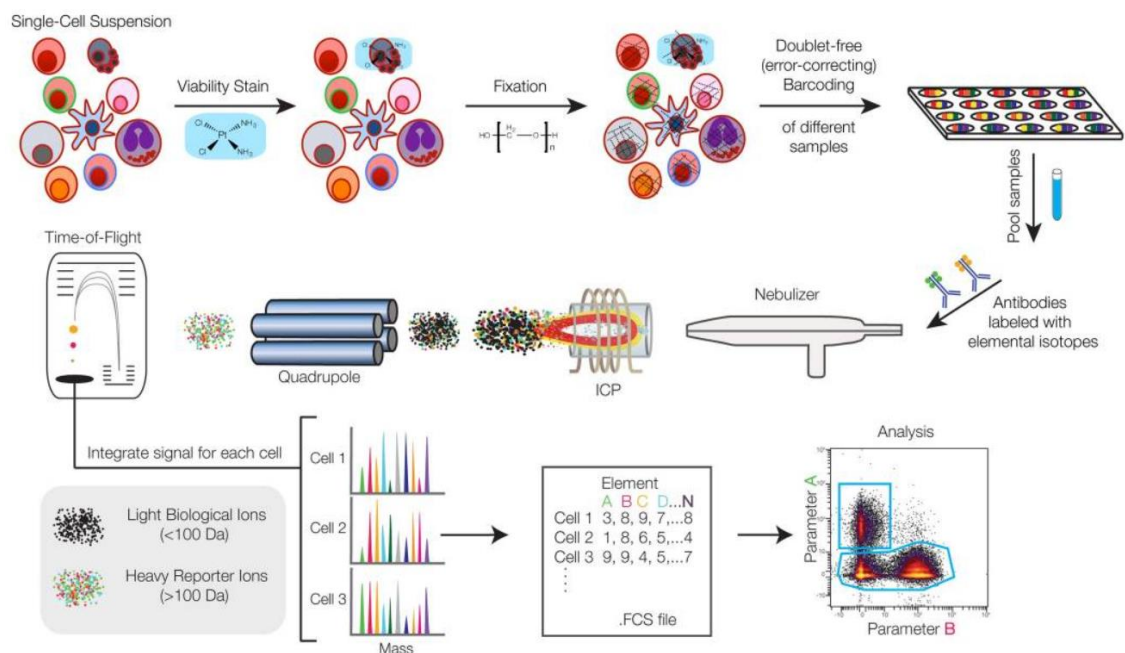


Figura 9. Workflow di un tipico esperimento con citometria di massa. Spitzer, M. H., & Nolan, G. P. (2016). Mass Cytometry: Single Cells, Many Features. *Cell*, 165(4), 780–791.

2. OBIETTIVI

In questa tesi saranno discussi i dati preliminari riferiti ad una casistica limitata di 4 pazienti all'interno dello studio REFLU, promosso dall'IRCCS Ospedale Policlinico San Martino. Lo scopo di questo studio è quello di valutare le caratteristiche immunologiche del tumore gastrico analizzando tramite la spettrometria di massa le cellule immunitarie circolanti, del tessuto tumorale e del tessuto sano adiacente al tumore, al fine di evidenziare potenziali fattori immunitari prognostici e predittivi, in termini di risposta alla chemioterapia, di sopravvivenza libera da malattia e di sopravvivenza globale, in pazienti sottoposti a chemioterapia perioperatoria.

Si tratta di uno studio prospettico i cui risultati potrebbero consentire la valutazione di possibili protocolli terapeutici alternativi personalizzati in pazienti affetti da tumore gastrico.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Reclutamento dei pazienti affetti da tumore gastrico e donatori sani

Sono stati analizzati 4 pazienti tra tutti quelli arruolati nello studio REFLU tra il 2020 e i primi mesi del 2024 (22 pazienti). Il reclutamento dei pazienti è stato gestito sotto il coordinamento della Dott.ssa Annamaria Pessino e del Dott. Fabio Catalano, nell'UO Oncologia Medica I presso l'IRCCS Ospedale Policlinico San Martino. Il comitato etico ha approvato lo studio.

Sono inclusi nello studio i pazienti affetti da tumore gastrico o della GEJ trattati con chemioterapia perioperatoria. I pazienti considerati arruolabili dovranno avere i criteri di eleggibilità di seguito elencati.

Criteri di inclusione:

- Età maggiore di 18 anni alla data della firma del consenso informato;
- Diagnosi istologica o citologica di adenocarcinoma gastrico o della GEJ;
- Stadio di malattia cT2-4a o cN⁺ eleggibile a un regime terapeutico di chemioterapia perioperatoria;
- Performance status ECOG \leq 2;
- Aspettativa di vita di almeno 12 mesi.

Criteri di esclusione:

- Performance status ECOG \geq 3.
- Presenza di seconda neoplasia diagnosticata e trattata nei 5 anni precedenti all'arruolamento.
- Metastasi a distanza.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti analizzati in questa tesi sono riportate in *Tabella 1*. Sono stati analizzati 5 donatori sani arruolati dal Centro Trasfusionale dell'Ospedale Policlinico San Martino, compatibili con i pazienti analizzati per età e sesso.

	Re002	Re003	Re008	Re018
Età e sesso	68 anni, M	56 anni, F	50 anni, M	65 anni, M
Famillarità	Nessuna	1 caso in famiglia di neoplasia (colon)	Nessuna	1 caso in famiglia di neoplasia
Comorbidità	Morbo di Crohn, ipotiroidismo	Nessuna	Artrite reumatoide	Nessuna
Terapie in atto	Nessuna	Nessuna	Metotrexate + daltacortene	Nessuna
Fumo	Si	Si (10 pack/year)	No	No
H. Pylori	-	-	+	+
HBsAg	-	+	-	-
HCV	-	-	-	-
HIV	-	-	-	-
Diagnosi	Adenocarcinoma gastrico	Adenocarcinoma GEJ	Adenocarcinoma gastrico	Adenocarcinoma GEJ, localmente avanzato Siewert II
IHC	MSS – HER2 neg	MSS – HER2 neg	MSS – HER2 neg	MSS – HER2 neg
Stadiazione pre-operatoria	uT4N0	uT4N+	uT4N+	cT4N+
Intervento	Gastrectomia parziale (13.10.2020)	Gastrectomia totale (30.11.2020)	Gastrectomia totale (18.06.2021)	Gastrectomia totale (31.05.2023)
Stadiazione post-operatoria	ypT3N0	ypT3N0	ypT3N2	ypT3N0
Terapia	FLOT 4 cicli + FLOT 2 cicli	FLOT 4 cicli + FLOT 4 cicli + radioterapia	FLOT 4 cicli + FLOT 3 cicli	FLOT 4 cicli + FOLFOX 4 cicli
Data arruolamento	02.07.2020	17.08.2020	25.01.2021	20.02.2023
Follow up (circa 1 anno dall'intervento)	CEA 3,6; CA19-9 20 No segni di recidiva all'imaging	CEA 2,9; CA19-9 27,8 No segni di recidiva all'imaging	CEA 3; CA19-9 <0,8 No segni di recidiva all'imaging	CEA 1; CA19-9 6,8 No segni di recidiva all'imaging
DFS*	3 anni e 6 mesi (ultimo follow-up)	2 anni e 2 mesi	2 anni e 8 mesi	1 anno (ultimo follow-up)
Recidiva	NO	24.03.2024 (peritoneo)	01.03.2023 (peritoneo)	NO
Note	Interrotta chemioterapia per tossicità		Non abbiamo prelievo POST	

Tabella 1. Caratteristiche cliniche dei pazienti analizzati.

La tabella riassume i dati anamnestici, laboratoristici e patologici dei pazienti analizzati. Inoltre, viene riportata la data di arruolamento, il follow-up a circa un anno dall'intervento (per fare un confronto clinico tra i pazienti), la sopravvivenza libera da malattia (DFS) e l'eventuale comparsa di recidiva.

*La DFS è stata calcolata dal trattamento chirurgico alla comparsa di recidiva (nei pazienti che all'ultimo follow-up preso in considerazione in questa tesi – primi mesi del 2024 – non avevano mostrato recidiva, il DFS è stato calcolato dal trattamento chirurgico alla data dell'ultimo follow-up).

IHC (immunoistochimica)

uTN: valutazione T e N in ecoendoscopia

cTN: valutazione T e N clinica

ypTN: valutazione T e N postCT e postoperatoria

3.2. Disegno dello studio

Per ogni paziente sono stati raccolti i campioni di PB (circa 10-15 mL di sangue) a differenti intervalli di tempo: prima dell'inizio del trattamento chemioterapico (PRE), prima del terzo ciclo di chemioterapia (T1), all'intervento chirurgico (INT), durante il quinto ciclo di chemioterapia (T2) e alla fine del trattamento (POST), anche in caso di progressione e/o citotossicità inaccettabile.

I pazienti sono trattati con chemioterapia perioperatoria, secondo schema FLOT, che consiste nella somministrazione endovenosa ogni 14 giorni di 5-Fluorouracile 2600 mg/mq (infusione continua di 24 ore), Oxaliplatino 85 mg/mq e Docetaxel 50 mg/mq. Uno schema alternativo, riservato ai pazienti più fragili, è lo schema FOLFOX, che

prevede l'infusione di endovenosa ogni 14 giorni di Oxaliplatino 85 mg/mq, Calcio Levofolinato 100 mg/mq, 5-Fluorouracile 400 mg/mq (infusione di 15 min) e 5-Fluorouracile 2400 mg/mq (infusione continua di 44 ore).

La stadiazione del carcinoma gastrico è stata effettuata secondo il sistema TNM (tumore-linfonodo-metastasi) del manuale di stadiazione (VIII edizione) dell'*American Joint Committee on Cancer (AJCC)/Union for International Cancer Control (UICC)*.

I pazienti sono sottoposti ad un follow-up clinico-strumentale mediante visita clinica, dosaggio dei marcatori tumorali (CEA e CA19.9) e imaging (TC) per la gestione delle tossicità, per la valutazione della risposta terapeutica, di eventuale recidiva di malattia, della sopravvivenza libera da malattia e della sopravvivenza globale.

3.3. Isolamento di PBMC e del plasma

Il plasma dai campioni di PB è stato isolato tramite centrifugazione e congelato a -80°C. L'analisi del plasma è ancora da effettuare.

La separazione delle PBMC dagli altri componenti del sangue è stata ottenuta tramite centrifugazione in gradiente di densità utilizzando Ficoll-Lympholyte-H (Cederlane).

In una provetta da 15 ml contenente 5 ml di Ficoll-Lympholyte-H (Cederlane) si stratificano 10 ml di sangue precedentemente diluito con un uguale volume di terreno RPMI 1640 (Gibco). Si centrifuga per 25' a 2000 rpm a temperatura ambiente, senza freno. Si recuperano i PBMC dall'anello all'interfaccia tra Ficoll e plasma, si trasferiscono in una nuova provetta a cui si aggiunge altro terreno e si centrifuga per 10' a 1800 rpm. Si risospende il pellet con terreno completo (RPMI 1640 con 10% siero fetale bovino -FBS, Euroclone-, 1% Penicillina/Streptomicina e glutammina -BioWhittaker-) e si centrifuga nuovamente per 10' a 1800 rpm. Il pellet viene risospeso in terreno completo e si procede con la conta cellulare.

I PBMC sono stati criopreservati. Per il congelamento i PBMC vengono risospesi in 1 ml di freezing solution (10% DimetilSolfossido, DMSO, 90% FBS) in criovials da 1.8 ml, e congelati prima a -80°C e successivamente trasferiti in azoto liquido.

3.4. Analisi di citometria di massa su PBMC

Per caratterizzare le popolazioni leucocitarie presenti nel PB abbiamo utilizzato la citometria di massa tramite lo strumento CyTOF.

3.4.1. Protocollo di staining per campioni di PBMC

Rimossi i campioni dall'azoto liquido e trasportati in laboratorio su ghiaccio secco, sono stati scongelati a bagnomaria a 37°C. Dopo aver scongelato il campione, le cellule sono state lavate con PBS senza siero, contate e infine è stata valutata la vitalità con Trypan blue (>80% cellule vive). Le cellule sono state risospese e lavate in Maxpar Cell Staining Buffer (CSB) e poi è stato aggiunto il colorante di vitalità Cell-ID Cisplatin 195Pt precedentemente titolato in Maxpar PBS (2,5 uM x 5 min). Successivamente, le cellule sono state lavate e contate per l'incubazione (max 3x10⁶ cellule) con il kit Maxpar® contenente 30 anticorpi, a cui sono stati aggiunti 12 anticorpi, di cui 7 coniugati nei nostri laboratori. Le cellule sono state lavate e fissate in paraformaldeide al 1,6% e infine è stato aggiunto l'intercalante nucleare Cell-ID™ Intercalator-Iridium. I campioni marcati sono stati congelati a -80°C e scongelati per l'acquisizione.

3.4.2. Anticorpi monoclonali

Per identificare le popolazioni mononucleate abbiamo scelto di utilizzare il kit commerciale Maxpar Direct Immune Profiling Assay (Maxpar®), che è stato acquistato da Standard Biotoools. Questo kit permette in un singolo tubo di riconoscere 30 marcatori specifici per le principali popolazioni di linfociti T, B, NK, monociti e DC.

Tag	Anticorpo	Clone	Tag	Anticorpo	Clone
141Pr	CD196 (CCR6)	G034E3	167Er	CD197 (CCR7)	G043H7
143Nd	CD123 (IL-3R)	6H6	168Er	CD14	63D3
144Nd	CD19	HIB19	170Er	CD3	UCHT1
145Nd	CD4	RPA-T4	171Yb	CD20	2H7
146Nd	CD8a	RPA-T8	172Yb	CD66b	G10F5
147Sm	CD11c	Bu15	173Yb	HLA-DR	LN3
148Nd	CD16	3G8	174Yb	IgD	IA6-2
149Sm	CD45RO	UCHL1	176Yb	CD127 (IL-7Ra)	A019D5
150Nd	CD45RA	HI100	89Y	CD45	HI30
151Eu	CD161	HP-3G10			
152Sm	CD194/CCR4	L291H4			
153Eu	CD25	BC96			
154Sm	CD27	O323			
155Gd	CD57	HCD57			
156Gd	CD183 (CXCR3)	G025H7			
158Gd	CD185 (CXCR5)	J252D4			
160Gd	CD28	CD28.2			
161Dy	CD38	HB-7			
163Dy	CD56 (NCAM)	NCAM16.2			
164Dy	TCRgd	11F2			

Tabella 2. Singolo tubo con 30 anticorpi coniugati a tag metallici.

A questo pannello abbiamo aggiunto altri anticorpi monoclonali coniugati a metalli che sono stati acquistati dalla stessa azienda (Standard Biotoools), in grado di indentificare i

seguenti marcatori: CD337 (NKp30) (clone: Z25) - 159Tb; CD335 (NKp46) (Clone: BAB281) - 162Dy; CD279/PD-1 (Clone: EH12.2H7) - 165Ho; CD278/ICOS (Clone: C398.4A) - 175Lu; TIGIT (Clone: MBSA43) - 209Bi.

Infine, per effettuare un'analisi completa delle sottopopolazioni NK abbiamo acquistato da diverse aziende i seguenti anticorpi, per poi procedere alla marcatura con metalli acquistati dalla Standard Biotools: CD69 (clone: REA824); CD158e1,e2 (clone: REA168) PanKIR2D (clone: NKVFS1); CD314 (NKG2D) (Clone: REA797); CD159c (NKG2C) (Clone: REA205); CD226 (DNAM-1) (Clone: REA1040) acquistati da Miltenyi Biotec. NKG2A (Clone: Z199) è stato acquistato da Beckman-Coulter.

I Kit di coniugazione acquistati da Standard Biotools: 110-Cd (MCP9); 112-Cd (MCP9); 114-Cd (MCP9); 116-Cd (MCP9); 142-Nd (X8); 169-Tm (X8).

3.4.3. Acquisizione del campione

Dopo che i campioni marcati sono stati congelati, le cellule sono state lavate 2 volte con Maxpar Cell Staining Buffer e 2 volte con Maxpar Cell Acquisition Solution (CAS) e risospese a 1×10^6 cellule/ml in EDTA a 2 mM in Maxpar Cell Acquisition Solution. Le cellule sono state filtrate con filtro da 30 micron poco prima dell'acquisizione.

L'acquisizione dei campioni di PBMC è stata eseguita su un sistema Helios (Standard Biotools).

3.4.4. Processamento file e analisi dati

I file in formato fcs sono stati normalizzati ed esportati per l'analisi tramite Flowjo, Matlab, R software. Sono state eseguite tecniche di riduzione dimensionale *Uniform Manifold Approximation and Projection* UMAP e analisi di *clustering* utilizzando gli algoritmi xshift e flowsom.

3.5. Analisi del tessuto gastrico all'intervento

All'intervento sono stati isolati campioni di tessuto gastrico pervenuti innanzitutto all'UO di Anatomia Patologica presso l'IRCCS Ospedale Policlinico San Martino per le indagini diagnostiche. L'analisi dell'infiltrato linfocitario (TILs) è stata condotta presso l'UO Immunologia a partire dai campioni di tessuto pervenuti dall'UO di Anatomia Patologica. Il materiale biologico è stato immediatamente processato in *single-cell suspensions* per sminuzzamento meccanico con forbici sterili e filtrato su filtro da 100 μm (Celbio S.p.A). L'omogenato ottenuto è stato poi separato mediante gradiente di densità (Ficoll Hypaque) per eliminare le cellule necrotiche.

4. RISULTATI

4.1. Caratterizzazione del repertorio leucocitario isolato da sangue periferico tramite citometria di massa con focus su linfociti T e NK.

Per effettuare l'analisi del repertorio linfoide di quattro pazienti affetti da adenocarcinoma gastrico, sottoposti a chemioterapia peri-operatoria con FLOT, abbiamo isolato le cellule mononucleate (*vedi Materiali e Metodi*) dal sangue periferico raccolto a diversi intervalli di tempo: PRE = prima della terapia; T1 = prima del terzo ciclo; INT = all'intervento; POST = dopo il quinto ciclo di terapia. I campioni sono stati congelati e conservati in azoto liquido per poi essere successivamente scongelati al momento di effettuare le analisi tramite la citometria di massa. Le caratteristiche dei pazienti analizzati (Re002, Re003, Re008, Re018) sono indicate in *Tabella 1* (*vedi Materiali e Metodi*).

Il grafico in *Figura 10* indica come la percentuale delle principali popolazioni di cellule mononucleate vive dopo lo scongelamento (monociti, linfociti B, T ed NK), calcolate in base ai dati degli emocromi, fosse simile nei pazienti e nei donatori sani utilizzati come controllo.

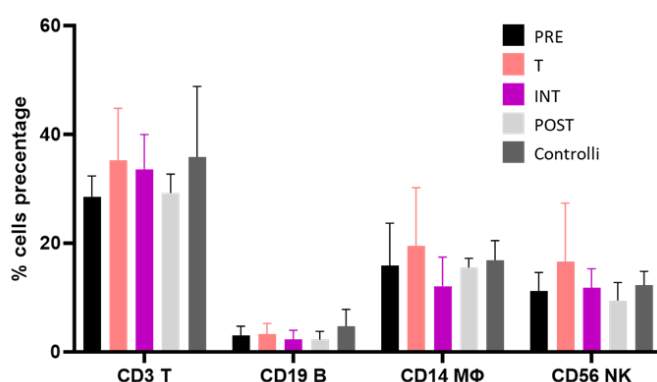


Figura 10. Analisi delle cellule mononucleate dopo scongelamento in base ai dati degli emocromi.

Le analisi sono state eseguite tramite una valutazione globale (analisi concatenata) che permette di avere un quadro generale delle frequenze delle diverse popolazioni CD45⁺, CD3⁺ e CD56⁺, per poi effettuare dei confronti specifici tra i donatori sani e i pazienti a diversi intervalli di tempo durante la terapia.

La *Figura 11* mostra la heatmap dell'analisi concatenata globale che ha permesso di identificare 32 popolazioni CD45⁺, isolate dal sangue periferico dei donatori sani e dei pazienti ai diversi intervalli di tempo ed esprime i marcatori per monociti, cellule dendritiche, linfociti T, B ed NK. Sul lato destro della heatmap è possibile identificare il numero del cluster e la relativa frequenza all'interno della popolazione CD45⁺.

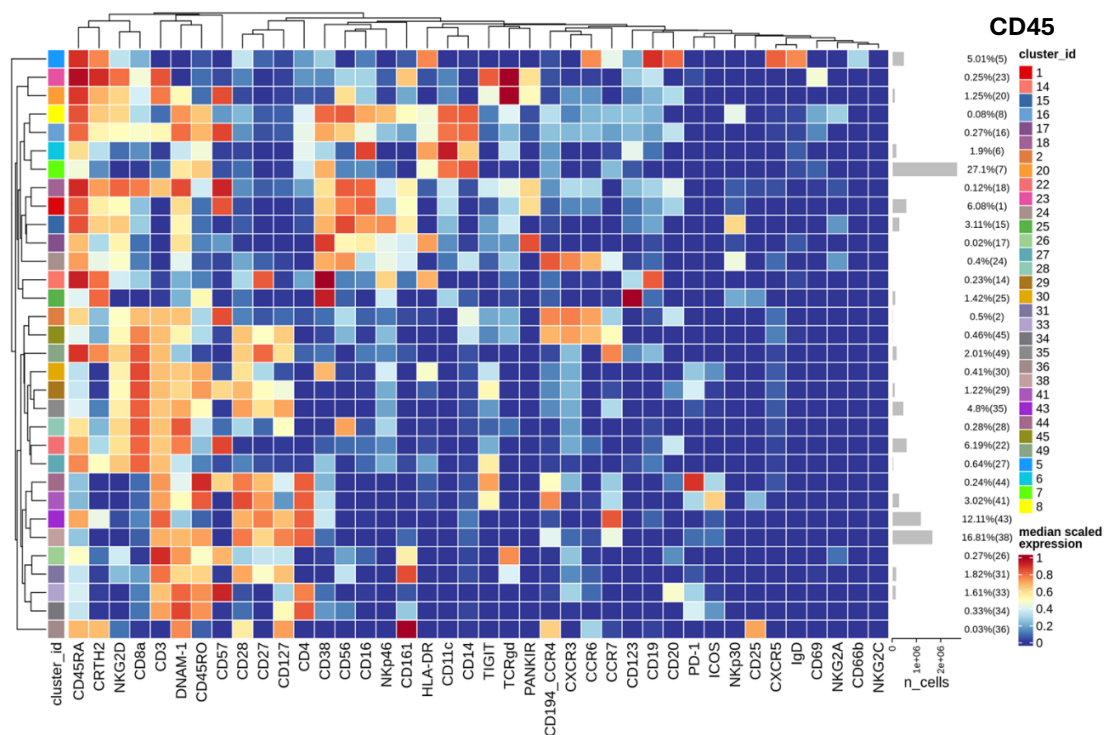


Figura 11. Caratterizzazione delle popolazioni leucocitarie CD45 in pazienti affetti da tumore gastrico tramite citometria di massa (Helios).

Le heatmap mostrano l'intensità di espressione dei recettori nel repertorio leucocitario ottenute tramite algoritmo FlowSOM dopo la fase di metaclustering con ConsensusClusterPlus. Il colore nella heatmap rappresenta la mediana dell'arcsinh (trasformata 0-1) calcolata su tutti i campioni, variando dal blu per l'espressione inferiore al rosso per l'espressione superiore. Il dendrogramma a sinistra rappresenta la somiglianza gerarchica tra i metacluster. Ogni cluster ha un colore univoco assegnato (barra a sinistra). Il grafico a barre lungo le righe (cluster) e i valori tra parentesi a destra indicano le percentuali relative delle popolazioni.

Per valutare meglio le potenzialità della citometria di massa nel caratterizzare i linfociti, abbiamo valutato in dettaglio le popolazioni di linfociti T ed NK.

La *Figura 12 (pannello A)* mostra la heatmap dell'analisi concatenata globale dei linfociti T CD3⁺ (CD14⁻CD19⁻CD33⁻CD3⁺ = 47,8%): si possono identificare 30 diversi clusters, ciascuno con la propria frequenza indicata a lato. Sono evidenziabili popolazioni presenti anche in basse percentuali, quali i linfociti TCR γ/δ (clusters 8, 11, 12, 29), i linfociti Treg (CD4⁺CD127⁻CD25⁺ICOS⁺TIGIT⁺; cluster 2) e i linfociti CD4 (cluster 4) e CD8 (cluster 21 e 22) con marcatori caratteristici dei linfociti T follicolari (CXCR5⁺, ICOS⁺, PD-1⁺). Da notare come si identifichino diversi clusters di linfociti T esprimenti gli immunocheckpoint PD-1 e TIGIT. La *Figura 12 (pannello B)* mostra i grafici UMAPs dove l'analisi concatenata viene visualizzata con grafici bidimensionali "a nuvola" (*vedi legenda*).

Un'analisi simile è stata effettuata anche sui linfociti NK (CD3⁻CD19⁻CD14⁻CD56⁺ 11,6%): per la prima volta la citometria di massa è stata applicata per caratterizzare le diverse sottopopolazioni NK presenti nel sangue periferico, permettendoci di identificare 16 diversi clusters (*Figura 13, pannello A*). È possibile identificare sulla heatmap clusters

anche piccoli caratterizzati dall'espressione di molti recettori per chemochine (CCR4, CCR6, CCR7, CXCR3 e CXCR5), quali il cluster 12 CD56^{bright} CXCR5⁺TIGIT⁺ e i clusters 6 e 11 CD56^{dim/-}CD16⁺CD57⁺ *adaptive*.

Inoltre, è possibile valutare molto bene l'espressione dei vari recettori attivatori (NKp46, NKp30, NKG2D, DNAM-1) nei diversi clusters CD56^{bright} o CD56^{dim}. In particolare, si identificano una popolazione maggioritaria CD56^{dim}CD16⁺CD57⁺KIR⁺ *adaptive* (cluster 2) che ha una bassa espressione di NKp46 e NKp30, e una popolazione CD56⁺CD16⁺CD57⁻ NKG2A⁻KIR⁻TIGIT⁺ (cluster 3) che invece li esprime molto bene, analogamente ad una popolazione CD56^{bright}CD57⁻NKG2A⁺KIR⁻ (cluster 7). È importante osservare che l'analisi globale non ha identificato popolazioni NK esprimenti PD-1, mentre erano visibili diversi clusters esprimenti TIGIT. La *Figura 13 (pannello B)* mostra anche qui le UMAP che descrivono la distribuzione e l'intensità di espressione dei diversi marcatori. In questi grafici è più facile osservare come i recettori per le chemochine siano co-espressi dagli stessi clusters e che i linfociti NK TIGIT⁺ siano prevalentemente popolazioni CD16⁺ CD57⁻.

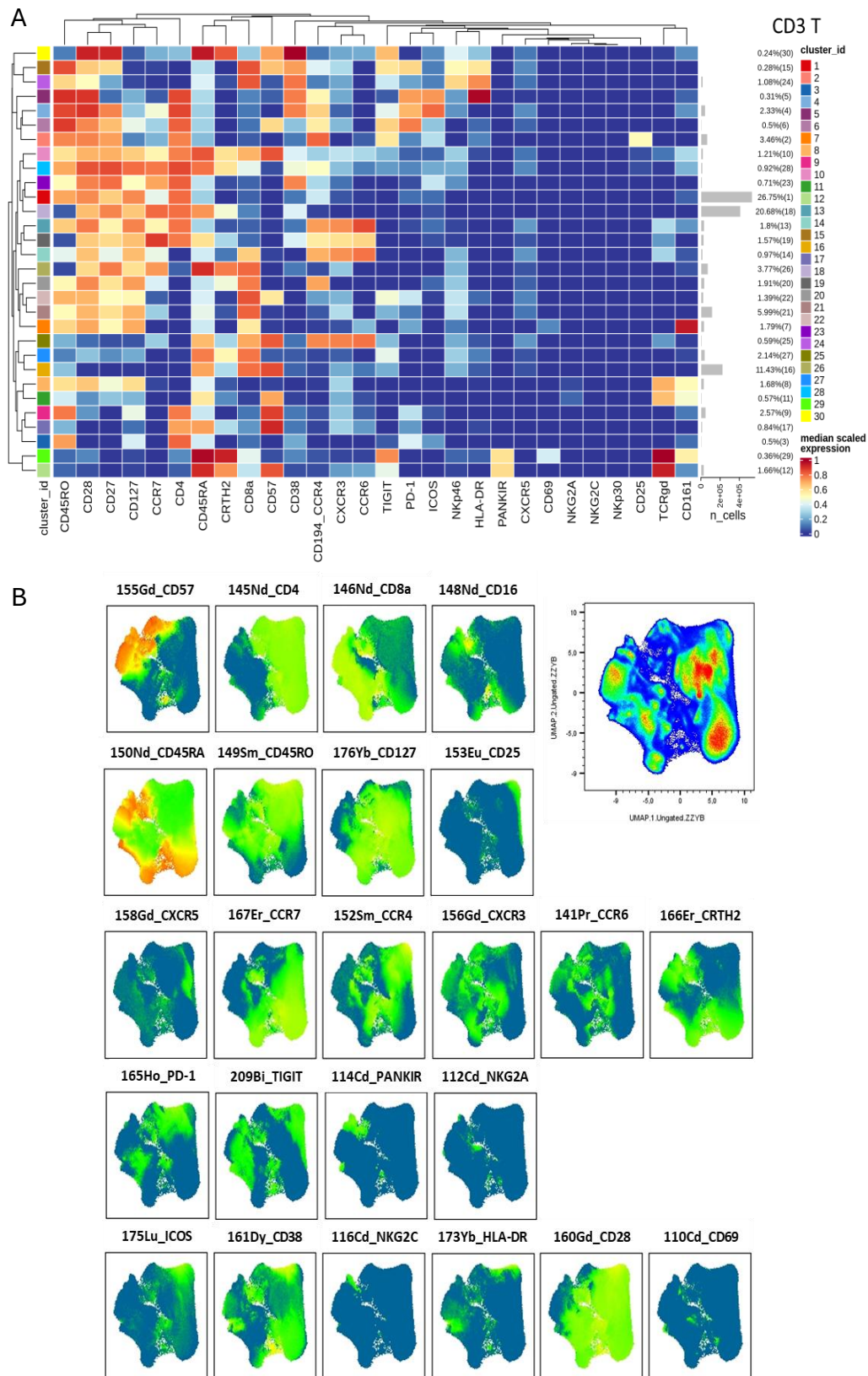


Figura 12. Caratterizzazione dei linfociti T in pazienti affetti da tumore gastrico tramite Helios.

A) La heatmap mostra i cluster dei linfociti T e la relativa intensità media di espressione dei marcatori di membrana, ottenuti tramite algoritmo FlowSOM dopo la fase di metaclustering con ConsensusClusterPlus. Il colore nella heatmap rappresenta la mediana dell'arcsinh (trasformata 0-1) calcolata su tutti i campioni, variando dal blu per l'espressione inferiore al rosso per l'espressione superiore. Il dendrogramma a sinistra rappresenta la somiglianza gerarchica tra i metacluster. Ogni cluster ha un colore univoco assegnato (barra a sinistra). Il grafico a barre lungo le righe (cluster) e i valori tra parentesi a destra indicano le percentuali relative delle popolazioni.

B) Il grafico UMAP mostra l'intensità di espressione dei diversi marcatori del repertorio T. L'intensità di espressione va dal rosso (massima) al blu (minima).

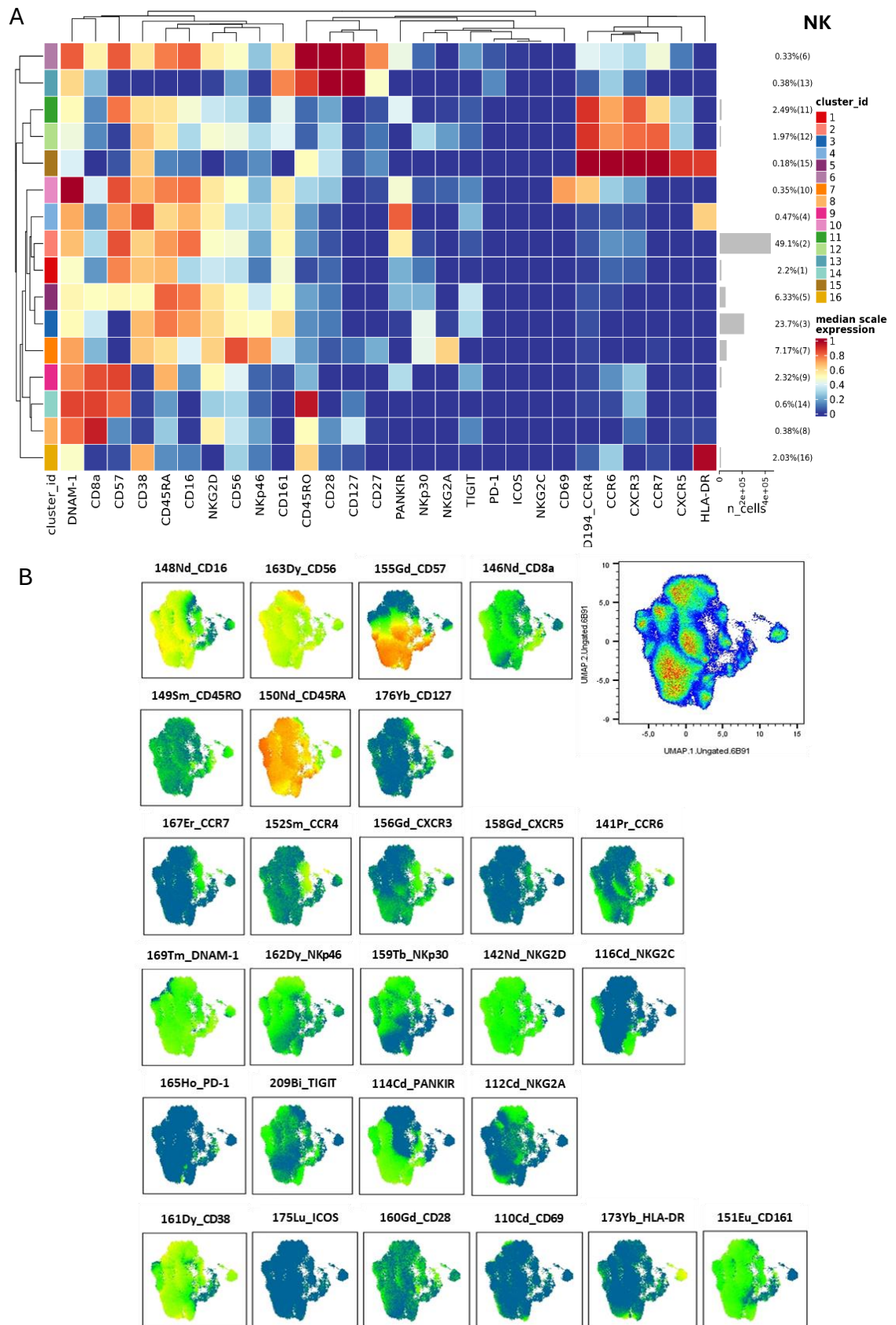


Figura 13. Caratterizzazione dei linfociti NK in pazienti affetti da tumore gastrico tramite Helios.

A) Le heatmap mostrano l'intensità di espressione dei recettori nelle popolazioni NK ottenute tramite algoritmo FlowSOM dopo la fase di metaclustering con ConsensusClusterPlus. Il colore nella heatmap rappresenta la mediana dell'arcsinh (trasformata 0-1) calcolata su tutti i campioni, variando dal blu per l'espressione inferiore al rosso per l'espressione superiore. Il dendrogramma a sinistra rappresenta la somiglianza gerarchica tra i metacluster. Ogni cluster ha un colore univoco assegnato (barra a sinistra). Il grafico a barre lungo le righe (cluster) e i valori tra parentesi a destra indicano le percentuali relative delle popolazioni.

B) Il grafico UMAP mostra l'intensità di espressione dei diversi marcatori del repertorio NK. L'intensità di espressione va dal rosso (massima) al blu (minima).

4.2. La chemioterapia non influenza il repertorio linfocitario dei pazienti che però evidenziano un repertorio T e NK significativamente diversi tra loro.

Pur in presenza di una casistica estremamente ridotta e poco rappresentativa, abbiamo cercato di capire se la chemioterapia FLOT potesse in qualche modo aver modificato il repertorio linfocitario dei pazienti rispetto ai donatori sani e/o rispetto al repertorio osservato negli stessi pazienti prima dell'inizio della terapia.

Inizialmente abbiamo valutato potenziali differenze tra i donatori sani e i pazienti prima dell'inizio della terapia (= PRE). Abbiamo effettuato l'analisi sulle popolazioni CD45⁺ e poi separatamente sui linfociti T e sui linfociti NK. A questo scopo, abbiamo effettuato un'analisi di abbondanza differenziale e cioè, abbiamo confrontato la differenza di quantità delle diverse sottopopolazioni presenti nei diversi campioni (sani vs pazienti). Nel nostro caso, l'analisi ha evidenziato una significativa maggior frequenza del cluster 24 (NK^{bright} CXCR5⁺TIGIT⁺) e del cluster 14 (B memory) nelle CD45⁺ dei pazienti rispetto ai donatori sani (Figura 14).

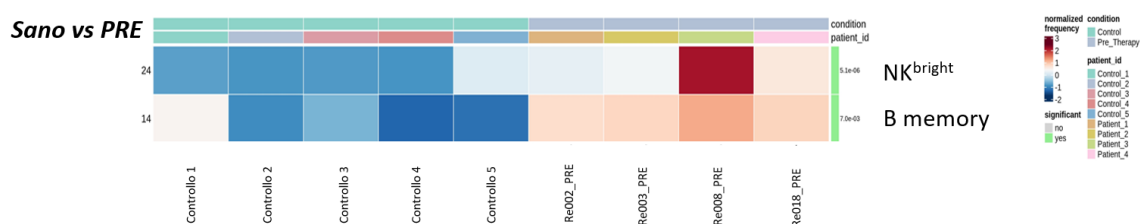
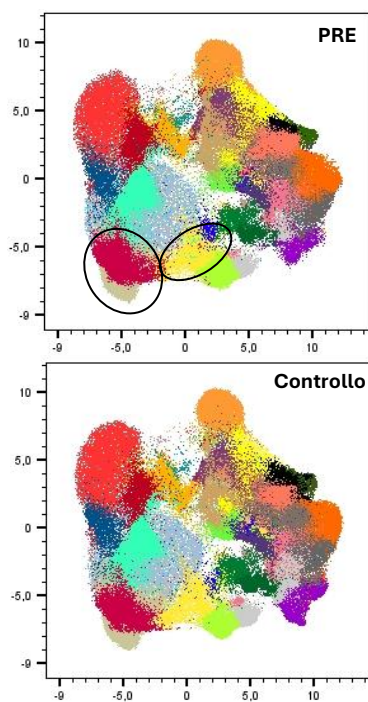
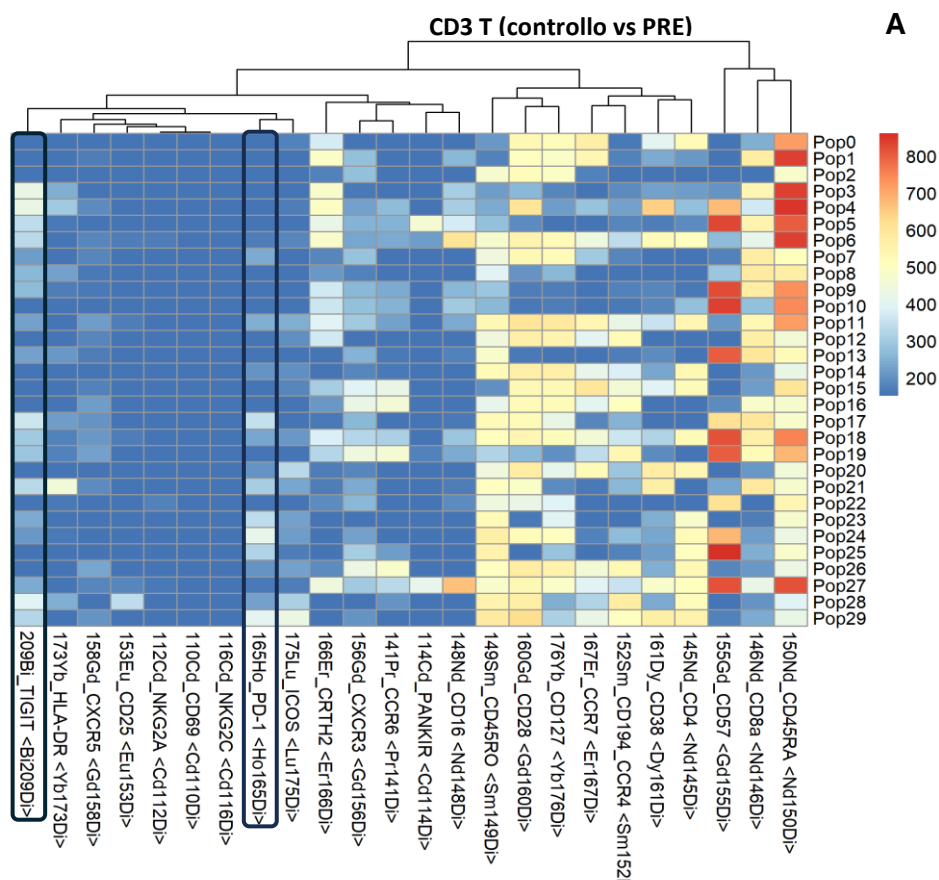


Figura 14. Rappresentatività delle popolazioni leucocitarie nei pazienti affetti da tumore.

La heatmap mostra l'abbondanza differenziale delle popolazioni leucocitarie dal confronto tra donatori sani e pazienti prima dell'inizio della terapia (PRE). Le colonne in alto identificano con il codice colore l'intervallo di tempo e il paziente. A sinistra è presente il numero di ogni cluster. La colonna a destra mostra l'analisi statistica. I dati sono stati analizzati tramite analisi GLMM con significatività * $p < 0,05$.

La Figura 15 (pannello A) mostra la heatmap ottenuta dall'analisi del repertorio dei linfociti T CD3⁺ osservato nei pazienti PRE a confronto coi donatori sani. Dall'analisi non si evidenziavano differenze significative tra i linfociti T CD3⁺ circolanti nei pazienti PRE rispetto ai donatori sani come si evince dalle UMAP (Figura 15, pannello B), rappresentanti l'analisi concatenata delle due categorie di soggetti. In questo caso, nei grafici UMAP (pannello B) si riconoscono diverse nuvole colorate di diverse dimensioni e ognuna di queste identifica un cluster e la sua numerosità. Nuvole vicine rappresentano popolazioni con caratteristiche fenotipiche simili. Dal punto di vista della distribuzione degli immuno-checkpoint, si può osservare sulla heatmap (pannello A) come ci siano molti clusters esprimenti PD-1 e/o TIGIT. In particolare, i linfociti T PD-1⁺TIGIT⁺ sono prevalentemente CD4⁺ e la loro numerosità è leggermente superiore nei pazienti rispetto

ai controlli sani (clusters 23, 24, 28, 29 per una frequenza totale del 7,3% nei pz vs 5,2% nei sani).



B

Sample Name	Subset Name	PRE	HC
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop29	7509	5638
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop28	12538	15511
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop27	1459	3213
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop26	11288	10589
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop25	5257	5780
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop24	7133	4497
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop23	2053	464
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop22	1472	2938
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop21	4184	2075
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop20	2389	2601
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop19	2874	2431
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop18	3279	4646
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop17	7222	15141
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop16	5602	4684
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop15	7117	4797
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop14	113812	156380
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop13	8617	21578
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop12	9967	5200
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop11	4047	4939
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop10	3142	12622
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop9	31843	27971
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop8	2564	4259
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop7	33259	41102
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop6	1070	671
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop5	8613	21859
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop4	823	585
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop3	4906	3480
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop2	9999	11303
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop1	15499	23751
concat_1_CD3_RED.fcs	FlowSOM.Pop0	75463	79035
concat_1_CD3_RED.fcs	Group.Pop0	4,00E5	5,00E5

Figura 15. Confronto dei linfociti T CD3 tra pazienti all'intervallo pre-terapia e donatori sani.

A) La heatmap mostra l'intensità di espressione dei marcatori in tutti i cluster generati attraverso l'algoritmo di clustering FlowSOM. L'intensità di espressione varia dal rosso (massima) al blu (minima).

B) Le UMAP visualizzano i cluster di linfociti T generati dall'algoritmo di clustering FlowSOM. I cluster sono evidenziati con colori differenti. Nella tabella a destra si osservano le frequenze dei cluster nei pazienti all'intervallo pre-terapia e nei donatori sani.

L'analisi dettagliata del confronto delle cellule NK dei pazienti PRE rispetto ai donatori sani (Figura 16, A) ha confermato la differenza significativa per le cellule NK^{bright}CXCR5⁺TIGIT⁺ (vedi cluster 24 Figura 14) e, dalla valutazione delle UMAP si evidenzia una maggiore numerosità dei clusters 1, 4, 6, 8, 12 nei pazienti PRE, mentre nei sani sono più rappresentati i clusters 3, 11, 14 (Figura 16, B).

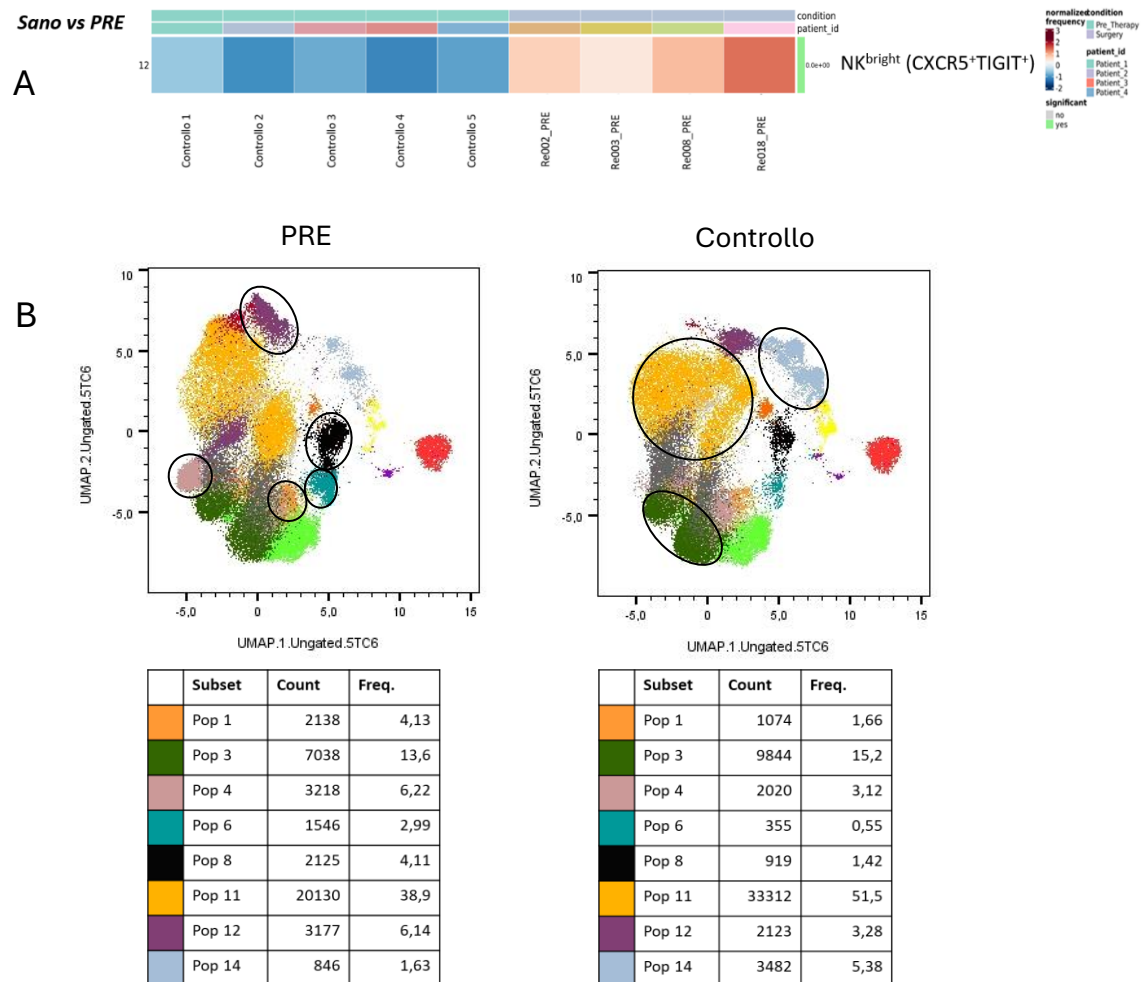


Figura 16. Confronto dei linfociti NK tra pazienti all'intervallo pre-terapia e donatori sani.

A) La heatmap mostra l'abbondanza differenziale delle popolazioni NK dal confronto tra donatori sani e pazienti prima dell'inizio della terapia (PRE). I dati sono stati analizzati tramite analisi GLMM con significatività $*p < 0,05$. B) Le UMAP visualizzano i cluster di linfociti NK nei pazienti all'intervallo pre-terapia e nei donatori sani, generati dall' algoritmo di clustering FlowSOM. I cluster sono evidenziati con colori differenti. Nelle tabelle associate al di sotto si osservano le frequenze dei clusters.

Pop 1 (CD56^{bright} chemokines⁻ TIGIT^{dull}CD57⁻); Pop 3 e Pop4 (CD56⁺CD16⁺ chemokines⁻ TIGIT⁺⁺CD57⁻); Pop 6 (CD56^{bright} chemokines⁺ TIGIT^{dull}); Pop 8 (CD16⁺CD57⁺KIR⁺ chemokines⁺ TIGIT^{dull}); Pop 11 (CD56⁺CD16⁺ chemokines^{dull} TIGIT^{dull} CD57⁺NKG2C⁻); Pop 12 (CD56⁺CD16⁺ chemokines^{dull} TIGIT⁺⁺CD57⁺NKG2C⁺); Pop 14 (CD56^{bright}CD57⁺ chemokines^{dull} TIGIT^{dull})

A questo punto, abbiamo valutato se i pazienti mostrassero delle variazioni significative del loro repertorio in risposta alla terapia ai diversi intervalli di tempo. Per effettuare l'analisi abbiamo confrontato gli intervalli PRE vs INT e INT vs POST. La chemioterapia non ha cambiato in modo significativo il repertorio dei pazienti (non mostrato), che

rimane stabile nel tempo, ma abbiamo osservato delle differenze significative tra i pazienti stessi. La *Figura 17* mostra l'analisi di abbondanza che ha indentificato popolazioni T ed NK significativamente diverse tra i vari pazienti agli intervalli di tempo indicati. In particolare, le popolazioni $NK^{bright}TIGIT^+$, $NK^{dim}TIGIT^+$, T CD4 e CD8 follicolari (Tfh), Treg (esprimenti TIGIT, PD-1 e ICOS) e T *effector memory* (EM). Si può rilevare come ogni paziente mantenga il proprio repertorio stabile ai diversi intervalli e come i pazienti Re003 e Re018 presentino delle similitudini, in particolare per quel che riguarda l'aumentata frequenza dei linfociti Treg, CD4 Tfh ed T EM.

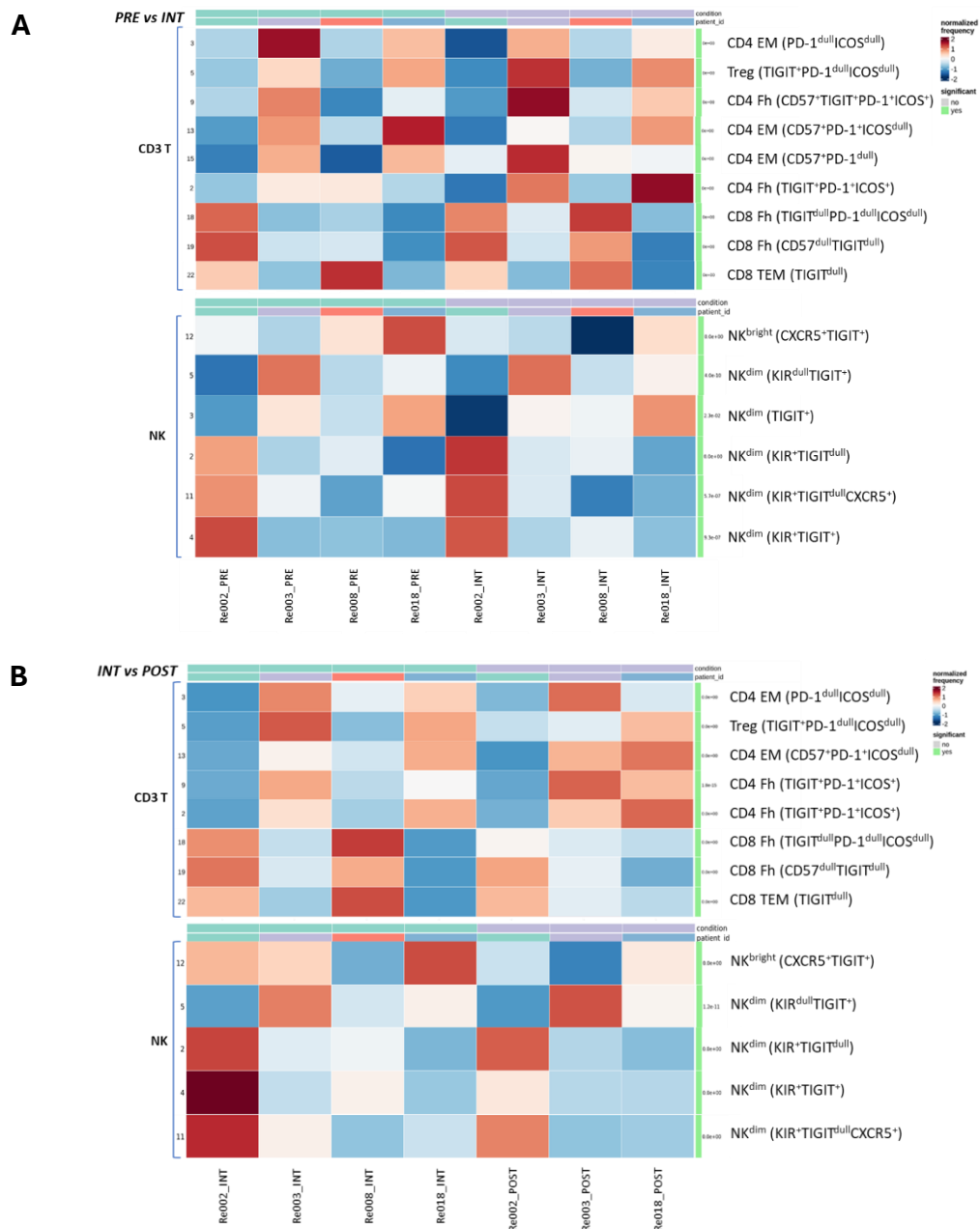


Figura 17. Rappresentatività ai diversi intervalli delle popolazioni NK e di linfociti T nei pazienti affetti da tumore gastrico.

La heatmap mostra l'abbondanza differenziale delle popolazioni NK e delle popolazioni T nei pazienti ai diversi intervalli di tempo, in particolare pre-terapia vs intervento (A) e intervento vs post-intervento (B). Le colonne in alto identificano con il codice colore l'intervallo di tempo e il paziente. A sinistra è presente il numero di ogni cluster. La colonna a destra mostra l'analisi statistica. I dati sono stati analizzati tramite analisi GLMM con significatività $*p < 0,05$. Da notare che del paziente Re008 non disponevamo del campione POST.

A questo riguardo, l'analisi istologica dei campioni isolati all'intervento ha rivelato una diversa risposta tissutale da parte dei diversi pazienti (*Tabella 3*), in particolare il paziente Re002 manifestava la migliore risposta (Mandard = 3) mentre Re018 la peggiore (Mandard = 5). Inoltre, i pazienti Re003 e Re018 mostravano un infiltrato più marcato e la presenza di strutture linfoidi terziarie (*Tabella 4 e Figura 18*, paziente rappresentativo Re018).

	Stadio TNM	Grado regressione neoplasia			MMR protein ⁴
		TRG Mandard ¹	TRG Becker ²	TRG Tsekrekos ³	
Re002	T3N0M0R0	3	2	3	MMRp
Re003	T3N0M0R1	4	3	3	MMRp
Re008	T3N2M0R0	4	3	4	MMRp
Re018	T3N0M0R0	5	3	4	MMRp

Tabella 3. Grado di regressione della neoplasia (post terapia neoadiuvante).

Nella tabella vengono indicati per ogni paziente analizzato lo stadio TNM con la valutazione del margine di resezione (R), il Tumor Regression Grading (TRG) secondo tre diverse classificazioni (Mandard, Becker e Tsekrekos) e l'eventuale instabilità dei microsatelliti in base all'espressione delle proteine del Mismatch Repair (MMR).

¹ **TRG Mandard** → Gruppo 1 (regressione completa); Gruppo 2 (fibrosi con sparse cellule tumorali); Gruppo 3 (preponderante fibrosi e cellule tumorali); Gruppo 4 (fibrosi e preponderanti cellule tumorali); Gruppo 5 (nessuna regressione).

² **TRG Becker** → Gruppo 1a (non cellule tumorali residue); Gruppo 1b (<10% di cellule tumorali residue); Gruppo 2 (10-50% di cellule tumorali residue); Gruppo 3 (>50% di cellule tumorali residue).

³ **TRG Tsekrekos** (Human pathology 2019) → Grado 1 (assenza di tumore residuo); Grado 2 (<10% di tumore residuo); Grado 3 (10-50% di tumore residuo); Grado 4 (>50% di tumore residuo).

⁴ **MMRp** (proficient = stabilità dei microsatelliti); **dMMR/MSI** (deficient MMR/microsatellite instability)

	Mononucleati ¹	Aggregati linfoidi ²	Eosinofili ¹	Neutrofilii ¹	Istiociti ¹
Re002	1	0	1	0	0
Re003	1	3	1	1	0
Re008	2	2	1	1	0
Re018	2	3	1	3	1

Tabella 4. Analisi istologica delle cellule infiammatorie infiltranti il tumore e degli aggregati linfoidi.

Per ogni paziente sono state analizzate in ematossilina-eosina sezioni di tessuto tumorale prelevato all'intervento per quantificare il grado di infiltrazione infiammatoria e ricercare aggregati linfoidi.

¹ 0= assenti; 1= sparsi; 2= moderati; 3= numerosi.

² 0= assenti; 1= occasionali (1 per campo a 4x); 2= sparsi (2-3 per campo a 4x); 3= numerosi (>3 per campo a 4x).

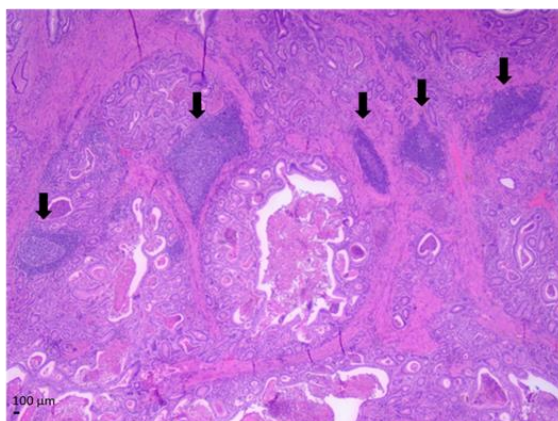


Figura 18. Analisi immunoistochimica del tessuto tumorale dei pazienti.

Immagine rappresentativa delle strutture linfoidi terziarie (TLS) rilevate in sezioni di tumore prelevato all'intervento del paziente Re018, fissate in formalina e incluse in paraffina, colorate con ematossilina ed eosina. Le frecce indicano le strutture linfoidi terziarie.

Abbiamo approfondito l'analisi sul sangue periferico dei pazienti Re002 e Re018 per valutare anche le differenze in termini di abbondanza delle popolazioni e di espressione dei recettori inibitori PD-1 e TIGIT. Il confronto ha rivelato nette differenze in termini di abbondanza di B *naïve* (CCR6⁺HLA-DR⁺), dendritiche plasmacitoidi (pDC CXCR5⁺TIGIT⁺), NK^{bright} e NK^{dim}TIGIT⁺ e di sottopopolazioni T tra cui T reg e T CD4 e CD8 fh CXCR5⁺ (Figura 19).

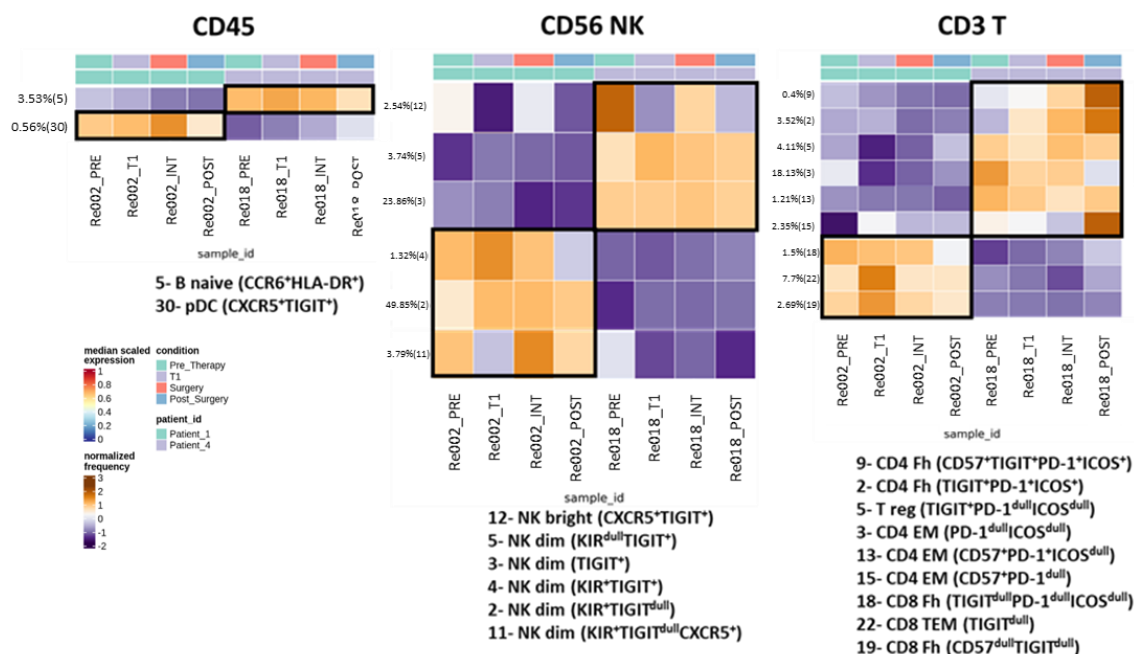


Figura 19. Caratterizzazione delle popolazioni leucocitarie CD45⁺, CD56⁺ NK e CD3⁺ T in pazienti affetti da tumore gastrico tramite Helios.

Le heatmaps da sinistra verso destra mostrano l'abbondanza differenziale rispettivamente delle popolazioni CD45⁺, NK e CD3⁺ nei pazienti Re002 e Re018, ottenute tramite algoritmo FlowSOM dopo la fase di metaclustering con ConsensusClusterPlus. Il colore nella heatmap rappresenta la mediana dell'arcsinh (trasformata 0-1) calcolata sui campioni dei pazienti, variando dal blu per l'espressione inferiore al rosso per l'espressione superiore (vedi in basso a sinistra). Nel grafico a barre lungo le righe vengono indicati a sinistra le percentuali relative delle popolazioni e tra parentesi il numero del cluster. Le colonne in alto identificano con il codice colore l'intervallo di tempo e il paziente. I dati sono stati analizzati tramite analisi GLMM.

Infine, l'analisi sull'espressione differenziale di TIGIT e PD-1 mostra che il paziente Re002 ha una maggiore intensità di espressione di TIGIT sulle popolazioni NK e si osserva anche una differenza di intensità di espressione di TIGIT e PD-1 anche all'interno delle sottopopolazioni di linfociti T (Figura 20).

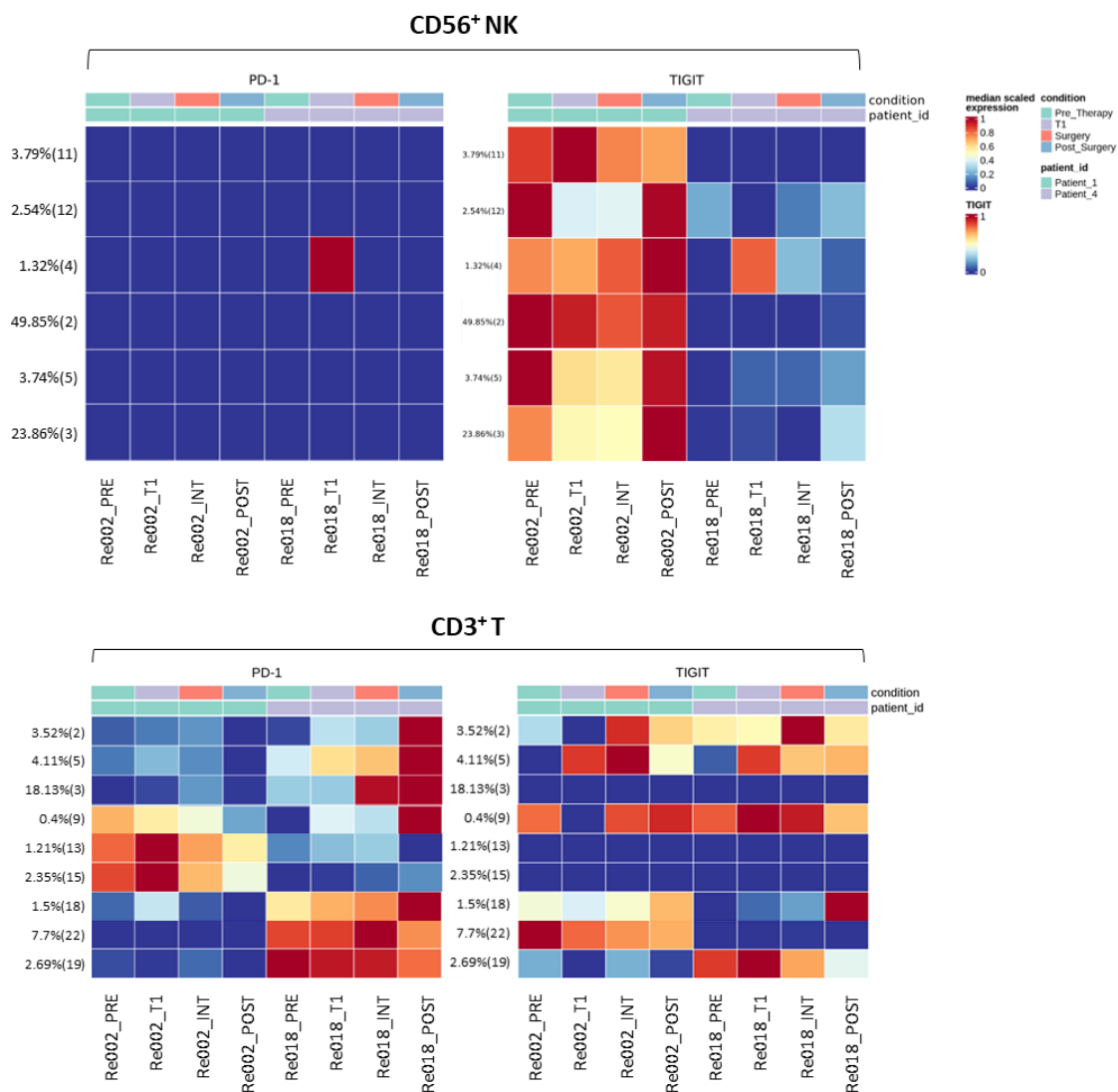


Figura 20. Analisi dell'espressione differenziale degli immuno-checkpoint PD-1 e TIGIT sulle popolazioni CD56⁺ NK e CD3⁺ T nei pazienti affetti da tumore gastrico.

Le heatmap mostrano l'espressione dei recettori inibitori PD-1 e TIGIT sulle popolazioni ottenute tramite FlowSOM dopo la fase di metaclustering con ConsensusClusterPlus nei diversi campioni, alla diagnosi, all'intervento e post-intervento nei pazienti Re002 e Re018. Questa heatmap rappresenta la mediana dell'arcsinh, 0-1 trasformata per il marcatore di membrana calcolata su ogni campione (colonne) singolarmente.

4.3. Valutazione dell'infiltrato linfocitario nel tessuto tumorale e confronto con il repertorio osservato nel sangue periferico: caso del paziente Re018.

Avendo evidenziato nei pz Re003 e Re018 un peculiare aumento di cellule Tfh e la presenza di TLS, abbiamo ritenuto fosse interessante valutare l'infiltrato linfocitario nel tessuto tumorale. Purtroppo, l'unico paziente in cui avevamo potuto raccogliere e congelare una sospensione cellulare significativa dal tessuto tumorale all'intervento era solo Re018. La sospensione di cellule mononucleate, su cui è stata fatta l'analisi con citometria di massa, era stata ottenuta tramite processamento meccanico del tessuto e successiva centrifugazione su gradiente di densità (*vedi Materiali e Metodi*). È da segnalare che, vista la scarsa risposta al trattamento del paziente Re018, era stato possibile processare un campione molto piccolo di tessuto non patologico, scarsamente infiltrato e, di conseguenza, la quantità di cellule mononucleate isolate da tale campione era stata irrisoria e non analizzabile.

Come si può vedere dalla UMAP (*Figura 21*), a livello del tessuto tumorale si può osservare una predominanza di cellule B che esprimono recettori per chemochine, in particolare CXCR5. Inoltre, si identificano diverse popolazioni di linfociti T CD4⁺ co-esprimenti marcatori caratteristici delle cellule Tfh (CXCR5⁺ICOS⁺TIGIT⁺; clusters 24, 27, 30). Questi risultati sono coerenti con il riscontro all'esame istologico di TLS (*vedi Figura 18*) e con l'aumentata presenza di cellule Tfh circolanti dello stesso paziente Re018 all'intervento (*vedi Figura 19*). L'analisi effettuata ha preso in considerazione gli stessi marcatori utilizzati nel periferico con l'eccezione di PD-1 (di cui non c'era più disponibilità del reagente).

Il grafico UMAP evidenzia molto bene come l'immuno-checkpoint TIGIT sia espresso prevalentemente da diversi clusters di cellule T CD4⁺ e dalle cellule NK^{bright}. Si tratta di popolazioni piccole se prese singolarmente ma che acquistano una certa importanza in termini di percentuale sul totale se considerate insieme (CD4⁺TIGIT⁺: pop24 3.35%, pop27 1.73%, pop30 2.42%= totale 7.5%). Confrontando questo dato con il sangue periferico, si può notare come tale tendenza si mantenga, dal momento che anche nel sangue periferico si osserva un'espressione di TIGIT soprattutto su cellule CD4⁺ e cellule NK^{bright}.

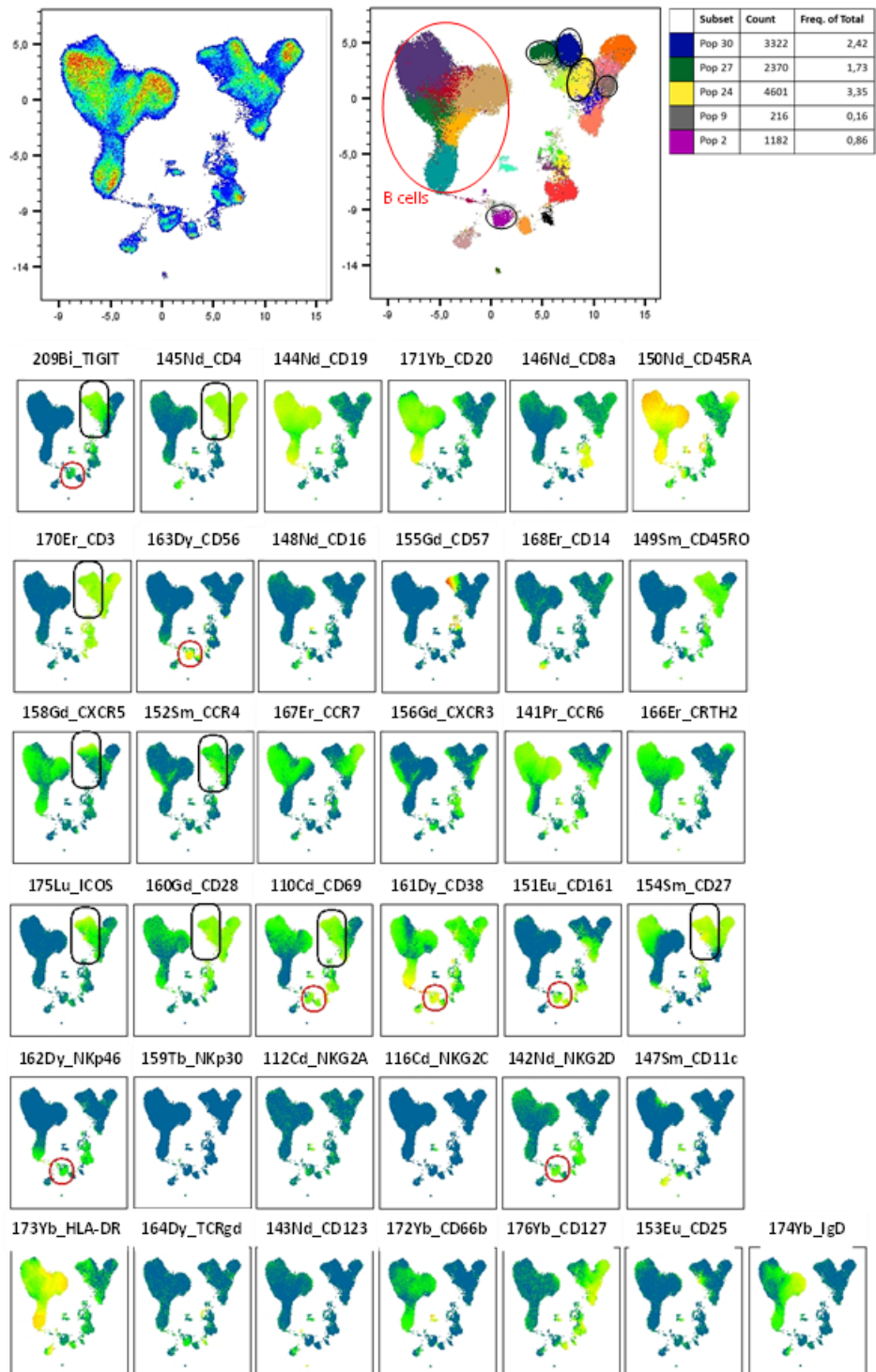


Figura 21. Caratterizzazione dell'infiltrato leucocitario CD45⁺ nel tessuto.

La UMAP mostra i cluster CD45⁺ ottenuti con l'algoritmo di clustering FLOWCYTOMETER. I cluster sono evidenziati con colori diversi. Il grafico UMAP mostra l'intensità di espressione dei diversi marcatori dei leucociti CD45⁺. L'intensità di espressione varia dal rosso (maggiore) al blu (minore).

La *Figura 22* mostra nel dettaglio il confronto dei marcatori espressi dai linfociti CD4⁺CXCR5⁺ del sangue periferico con quelli isolati dal tessuto tumorale. Si può osservare come la frazione isolata dal tessuto abbia un incremento di espressione di TIGIT ed esprima molto bene CXCR5 e meno altri recettori per chemochine. Inoltre, esprime molto bene anche ICOS e il marcatore di attivazione cellulare CD69.

Per quel che riguarda le cellule NK, la componente infiltrante era estremamente ridotta e in particolare era molto piccola la frazione CD56^{dim}CD16⁺ (*Figura 23*). Il confronto tra le CD56^{bright} presenti nel tessuto con quelle del periferico ha evidenziato un aumento della percentuale di CD56⁺ TIGIT⁺ CD69⁺ CCR6⁺ CXCR5⁺ CXCR3⁺.

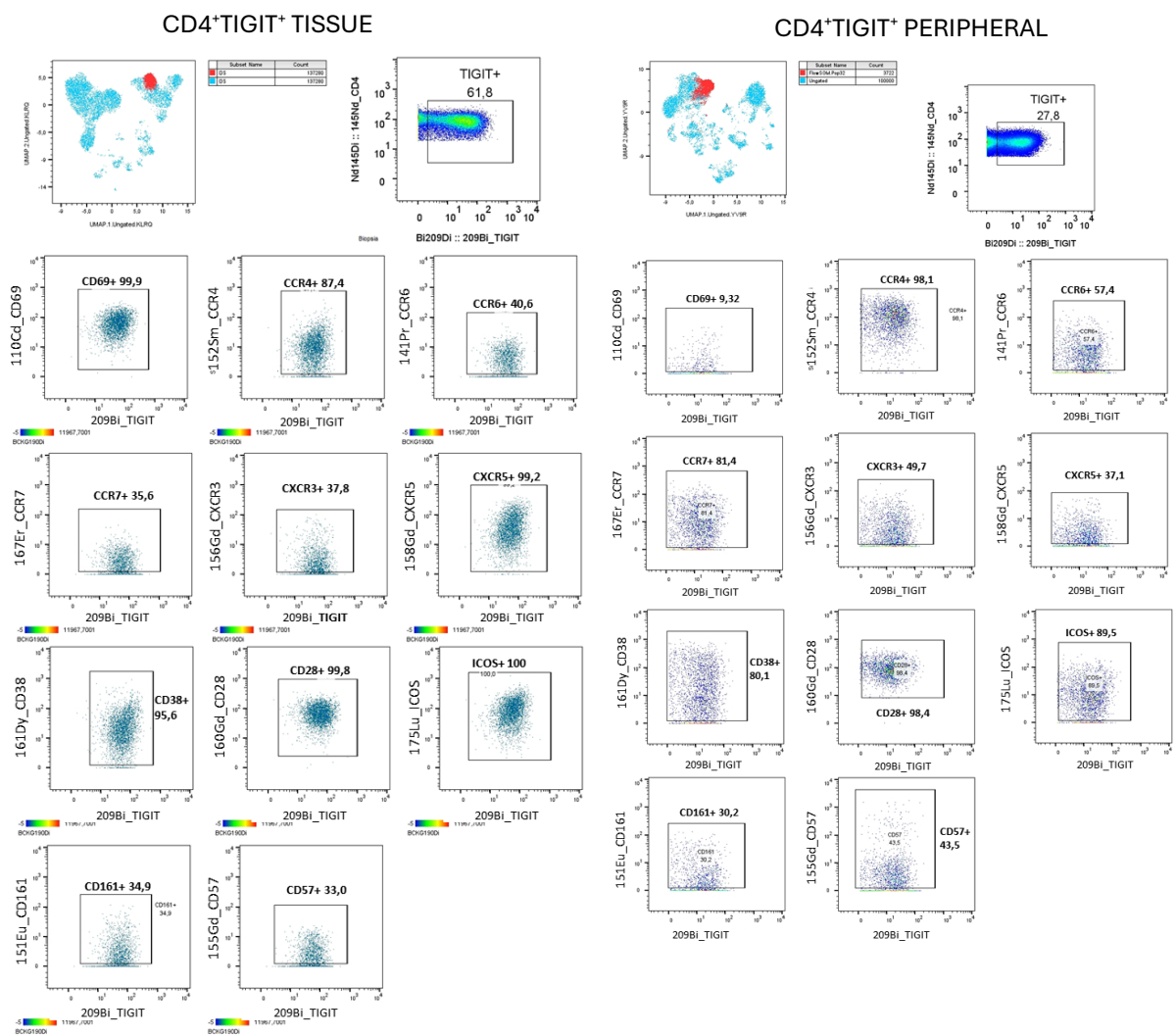


Figura 22. Confronto tra le popolazioni T CD4 TIGIT⁺ nel tessuto e nel sangue periferico del paziente Re018. L'analisi mostra il confronto tra le popolazioni T CD4 TIGIT⁺ nel tessuto e nel sangue periferico del paziente Re018: le UMAP mostrano la popolazione CD4 TIGIT⁺ colorata in rosso. I dot plots rivelano l'espressione dei recettori per le chemochine (CXCR5, CCR4, CCR6, CCR7, CXCR3), dei marcatori di attivazione (CD38, CD69), di maturazione (CD57), di co-stimolazione (CD28) e di exhaustion (ICOS).

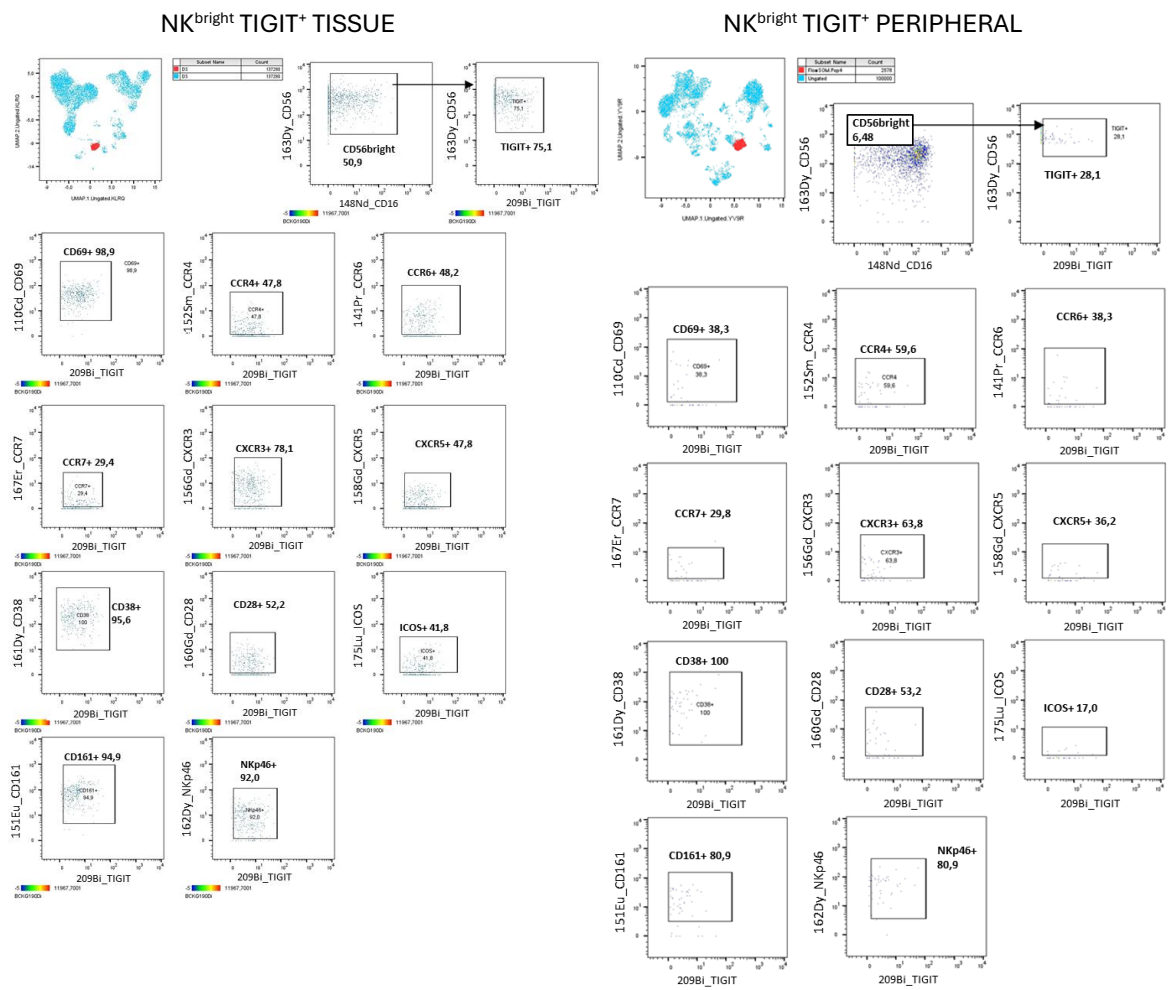


Figura 23. Confronto tra le popolazioni NK^{bright} TIGIT⁺ nel tessuto e nel sangue periferico del paziente Re018
L'analisi mostra il confronto tra le popolazioni NK^{bright} TIGIT⁺ nel tessuto e nel sangue periferico del paziente Re018: le UMAP mostrano la popolazione NK^{bright} TIGIT⁺ colorata in rosso. I dot plots rivelano l'espressione dei recettori per le chemochine (CXCR5, CCR4, CCR6, CCR7, CXCR3), dei marcatori di attivazione (CD38, CD69), di maturazione (CD57), di co-stimolazione (CD28), di exhaustion (ICOS).

5. DISCUSSIONE

Il carcinoma gastrico rimane uno dei tumori più comuni e mortali in tutto il mondo, occupando il quinto posto per incidenza e mortalità. Il trattamento prevede un approccio multimodale che unisce la chirurgia radicale con la chemioterapia (CT) perioperatoria. Tuttavia, la prognosi è in genere sfavorevole, rendendo necessarie nuove strategie terapeutiche più efficaci. Mentre l'uso delle terapie a bersaglio molecolare è ostacolato dall'elevata eterogeneità molecolare del tumore gastrico, negli ultimi anni, grazie al contributo di studi come KEYNOTE-062 e CHECKMATE-649, l'immunoterapia in aggiunta alla CT ha dato riscontri positivi, aumentando l'interesse all'uso degli inibitori del checkpoint immunitario (ICI) nel tumore gastrico. Tuttavia, la risposta clinica all'immunoterapia è molto eterogenea poiché l'efficacia clinica degli ICI dipende dall'infiltrazione di linfociti T e/o NK con una potenziale attività antitumorale soppressa dall'espressione dei checkpoint immunitari come PD-1 e TIGIT. Pertanto, al fine di migliorare l'uso degli ICI è necessaria un'accurata caratterizzazione dell'infiltrato linfocitario nel microambiente tumorale (TME) e del repertorio linfoide circolante. Lo scopo di questa tesi è verificare se tale caratterizzazione possa rappresentare uno strumento per indentificare marcatori nel sangue periferico (PB) che possano predire la qualità della risposta dei pazienti alla chemioterapia e, in base al profilo di espressione dei checkpoint immunitari, individuare i migliori candidati all'uso degli ICI.

In questo contesto, i nostri risultati, in linea con precedenti studi presenti in letteratura [79] [80] [81], confermano che la citometria di massa è uno strumento valido per caratterizzare il repertorio linfoide delle cellule T e inoltre, per la prima volta, anche il repertorio dei linfociti NK. Nel nostro caso, infatti, abbiamo identificato nel PB dei 4 pazienti analizzati ben 32 clusters di cellule mononucleate CD45⁺, 30 clusters di linfociti T e 16 clusters di linfociti NK. Tra questi clusters abbiamo ricercato delle popolazioni che potessero avere un ruolo positivo o negativo nella risposta antitumorale: abbiamo individuato delle popolazioni rare, come i linfociti Treg, che possono promuovere l'immunosoppressione nel tessuto tumorale [61], e i linfociti T follicolari (Tfh) che, interagendo con i linfociti B, contribuiscono alla formazione di strutture linfoidi terziarie (TLS) [52]. Inoltre, abbiamo individuato diverse sottopopolazioni di cellule NK in grado di infiltrare il tessuto tumorale grazie all'espressione dei recettori per le chemochine (CCR4, CCR6, CXCR3, CXCR5, CCR7). Tuttavia, a conferma della letteratura, questi recettori sono risultati essere espressi soprattutto dalle NK CD56^{bright}, cioè cellule dotate di funzione regolatoria in grado di produrre citochine, ma che non sempre sono in grado di differenziare ulteriormente in cellule CD56^{dim}CD16⁺ e quindi di acquisire attività

citotossica per poter contribuire direttamente all'eliminazione delle cellule tumorali. Invece, le cellule NK con maggior capacità citotossica, ovvero le NK CD56^{dim}CD16⁺ che hanno acquisito l'espressione di CD57⁺ diventando "adaptive", sono risultate la popolazione NK più abbondante nel PB dei pazienti, ma mostravano una bassa espressione dei recettori NKp46 e NKp30, il che suggerisce una debole responsività al tumore, come sottolineato in letteratura [73]. Abbiamo poi valutato l'espressione degli immuno-checkpoint facendo un confronto tra i pazienti e i donatori sani per individuare potenziali bersagli degli ICI: dall'analisi è emerso che nei pazienti le cellule NK del PB non esprimono il PD-1, ma alcuni clusters esprimono TIGIT. Tra questi il cluster rappresentato da NK^{bright} CXCR5⁺TIGIT⁺, è risultato significativamente più frequente nei pazienti rispetto ai donatori sani. Il blocco di TIGIT su queste cellule potrebbe favorire la produzione di citochine in grado di favorire un'efficace risposta infiammatoria contro il tumore. Riguardo il repertorio CD3, sono emersi diversi clusters di linfociti T esprimenti sia PD-1 sia TIGIT: si tratta soprattutto di linfociti CD4 e la loro numerosità è leggermente superiore nei pazienti rispetto ai controlli sani. Alcuni studi hanno visto che l'uso di anticorpi anti-TIGIT potrebbe bersagliare le cellule CD4 TIGIT⁺ che esercitano un effetto di supporto sulle cellule tumorali, fornendo un punto di vista alternativo nell'uso degli ICI non solo diretto a ripristinare le funzioni delle cellule citotossiche CD8⁺ [82]. Tuttavia, il ruolo dei recettori inibitori sulle cellule T helper CD4⁺ rimane largamente inesplorato. I nostri risultati rimangono comunque molto preliminari e servirebbero sia analisi funzionali, sia analisi più approfondite anche sul tessuto dei pazienti per verificare in parallelo al PB la diversa frequenza di espressione di PD-1 e TIGIT sui linfociti T ed NK infiltranti e l'espressione dei relativi ligandi (PDL-1 e CD155) sul tessuto tumorale: questo aiuterebbe a capire se il dato del PB, rispecchiando l'infiltrato tissutale, possa da solo essere sufficiente per effettuare eventuali scelte terapeutiche. Nel nostro caso, per ora abbiamo potuto confermare solo nel paziente Re018 il parallelismo tra PB e tessuto per quel che riguarda la presenza di linfociti T CD4⁺ TIGIT⁺ ed NK^{bright} TIGIT⁺, ma non abbiamo potuto confermare il dato su PD-1. Nella prospettiva di associare l'immunoterapia alla CT, abbiamo indagato se il repertorio linfocitario nel PB venisse influenzato dalla CT. Dal confronto dei diversi intervalli di tempo (PRE vs INT e INT vs POST) è emerso che il repertorio linfocitario di ogni paziente riscontrato prima della CT (PRE) si mantiene stabile e invariato anche dopo la CT (INT e POST). Questo potrebbe suggerire la possibilità di applicare fin da subito l'immunoterapia alla CT, senza attendere eventuali effetti CT-indotti. La stessa analisi ai diversi intervalli di tempo ha evidenziato che i pazienti, se confrontati tra di loro, presentavano delle differenze significative nel

loro repertorio linfocitario. In particolare, nei pazienti Re003 e Re018 vi era un aumento di linfociti T CD4⁺ fh e Treg, se paragonati ai pazienti Re002 e Re008. Per cercare di comprendere queste differenze abbiamo deciso di valutare possibili correlazioni con i referti anatomopatologici dei campioni isolati all'intervento, focalizzando l'attenzione soprattutto sulla risposta tissutale alla CT e sulla presenza di TLS. Effettivamente, il riscontro delle cellule Tfh nel PB dei pazienti Re003 e Re018 è coerente con l'identificazione a livello del loro tessuto tumorale di TLS. Tuttavia, al contrario di quanto viene riportato in letteratura, nel nostro caso la presenza di TLS non sembra rappresentare un fattore prognostico positivo, in quanto Re003 ha avuto una ricaduta di malattia, mentre Re018 ha mostrato la risposta tissutale peggiore alla CT. Il caso di Re018 richiede ulteriori valutazioni perché il paziente risulta comunque libero da malattia a distanza di 1 anno dall'intervento. Pertanto, occorrerà un follow-up più ampio per poter avanzare delle ipotesi più concrete. Un'altra differenza su cui ci siamo soffermati riguarda i pazienti Re002 e Re018: il primo, infatti, aveva nel PB un maggior numero di linfociti con potenziale attività citotossica, ovvero linfociti NK CD56^{dim}CD16⁺TIGIT⁺ e linfociti T CD8⁺ fh e CD8⁺ *effector memory* (EM), mentre Re018 aveva un aumento di linfociti con attività immunoregolatoria, ovvero linfociti NK CD56^{bright}, linfociti T CD4⁺ fh, Treg e T CD4⁺ EM, tutti PD-1⁺/TIGIT⁺. Considerando che Re002 è stato il paziente con la migliore risposta tissutale, mentre Re018 ha avuto la risposta peggiore, forse, di fronte ad una stimolazione cronica indotta dal tumore che favorisca l'espressione di immunocheckpoint come PD-1 e TIGIT sui linfociti T ed NK, la maggior frequenza di cellule potenzialmente citotossiche potrebbe rappresentare un fattore favorevole rispetto alla presenza di cellule con attività immunoregolatoria. Sicuramente, non possiamo fare ipotesi più concrete perché la casistica è limitata e manca l'analisi dei linfociti infiltranti degli altri pazienti. In conclusione, i nostri risultati, molto preliminari, suggeriscono che la citometria di massa permette un'accurata caratterizzazione del repertorio linfocitario, indentificando popolazioni circolanti anche scarsamente rappresentate, la cui frequenza può però rispecchiare la presenza di un infiltrato linfoide nel tumore con determinate caratteristiche. Inoltre, i dati indicano che, mentre PD-1 ha una distribuzione principalmente limitata ai linfociti T, l'espressione di TIGIT può essere diffusa su diverse popolazioni linfocitarie nel PB e nel tessuto, suggerendo che questa molecola potrebbe rappresentare un buon bersaglio terapeutico nell'ottica di combinare CT con immunoterapia, ripristinando non solo le funzioni dei linfociti T ma anche delle cellule NK, sia con potenziale attività citotossica che immunoregolatoria.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2024. **74**(3): p. 229-263.
2. Yang, W.J., et al., *Updates on global epidemiology, risk and prognostic factors of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2023. **29**(16): p. 2452-2468.
3. AIOM, *Linee guida sul carcinoma dello stomaco*. 2021; Available from: Linee guida sul carcinoma dello stomaco - AIOM 2021.
4. AIOM, *I numeri del cancro in Italia 2022*. 2022; Available from: https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2022/12/2022_AIOM_NDC-web.pdf.
5. Fondazione AIRC per la Ricerca sul Cancro, *Tumore dello Stomaco*. 2023; Available from: <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-dello-stomaco>.
6. Salvatori, S., et al., *Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Pathogenetic Mechanisms*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(3).
7. Petryszyn, P., N. Chapelle, and T. Matysiak-Budnik, *Gastric Cancer: Where Are We Heading?* Dig Dis, 2020. **38**(4): p. 280-285.
8. Hui, Y., et al., *Risk factors for gastric cancer: A comprehensive analysis of observational studies*. Front Public Health, 2022. **10**: p. 892468.
9. Zhu, H., et al., *Red and processed meat intake is associated with higher gastric cancer risk: a meta-analysis of epidemiological observational studies*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70955.
10. Li, L.F., et al., *Cigarette smoking and gastrointestinal diseases: the causal relationship and underlying molecular mechanisms (review)*. Int J Mol Med, 2014. **34**(2): p. 372-80.
11. Rawla, P. and A. Barsouk, *Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention*. Prz Gastroenterol, 2019. **14**(1): p. 26-38.
12. Iizasa, H., et al., *Development of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: Infection, inflammation, and oncogenesis*. World J Gastroenterol, 2022. **28**(44): p. 6249-6257.
13. Blair, V.R., et al., *Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical practice guidelines*. Lancet Oncol, 2020. **21**(8): p. e386-e397.
14. Lott, P.C. and L.G. Carvajal-Carmona, *Resolving gastric cancer aetiology: an update in genetic predisposition*. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2018. **3**(12): p. 874-883.
15. Iwatsuki, M., et al., *The comprehensive review of gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS) from diagnosis and treatment*. Ann Gastroenterol Surg, 2023. **7**(5): p. 725-732.
16. Peltomaki, P., et al., *Lynch Syndrome Genetics and Clinical Implications*. Gastroenterology, 2023. **164**(5): p. 783-799.
17. Correa, P., *Gastric cancer: overview*. Gastroenterol Clin North Am, 2013. **42**(2): p. 211-7.
18. Edge, S.B., Byrd, D. R., Compton, C. C., Fritz, A. G., Greene, F. L., & Trotti, A., *AJCC Cancer Staging Manual (7th ed.)*, ed. Springer. 2010.
19. Ma, J., et al., *Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer*. Oncol Lett, 2016. **11**(5): p. 2959-2964.

20. Abbas, A.K., Fausto, N., Kumar, V., & Aster, J. C., *Patologia generale - Robbins e Cotran vol 2: Le basi patologiche delle malattie*, ed. E. srl. 2015.
21. Machlowska, J., et al., *Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
22. Lordick, F., et al., *Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2022. **33**(10): p. 1005-1020.
23. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
24. Rugarli, C., *Medicina interna sistematica*. , ed. E. Masson. 2015.
25. The American Cancer Society medical and editorial content team, *Stomach Cancer Stages*. 2021; Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/stomach-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>.
26. Ychou, M., et al., *Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial*. Journal of clinical oncology, 2011. **29**(13): p. 1715-1721.
27. Al-Batran, S.-E., et al., *Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial*. The Lancet, 2019. **393**(10184): p. 1948-1957.
28. Van Cutsem, E., et al., *Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group*. J Clin Oncol, 2006. **24**(31): p. 4991-7.
29. Bang, Y.J., et al., *Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial*. Lancet, 2010. **376**(9742): p. 687-97.
30. Wilke, H., et al., *Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2014. **15**(11): p. 1224-35.
31. Shitara, K., et al., *Trifluridine/tipiracil versus placebo in patients with heavily pretreated metastatic gastric cancer (TAGS): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. The Lancet Oncology, 2018. **19**(11): p. 1437-1448.
32. Gubin, M.M. and M.D. Vesely, *Cancer Immunoediting in the Era of Immunooncology*. Clin Cancer Res, 2022. **28**(18): p. 3917-3928.
33. Lasek, W., *Cancer immunoediting hypothesis: history, clinical implications and controversies*. Cent Eur J Immunol, 2022. **47**(2): p. 168-174.
34. Cha, J.H., et al., *New Approaches on Cancer Immunotherapy*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2020. **10**(8).
35. Guan, W.L., Y. He, and R.H. Xu, *Gastric cancer treatment: recent progress and future perspectives*. J Hematol Oncol, 2023. **16**(1): p. 57.

36. Chen, L. and X. Han, *Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future*. J Clin Invest, 2015. **125**(9): p. 3384-91.
37. Muro, K., et al., *Relationship between PD-L1 expression and clinical outcomes in patients (Pts) with advanced gastric cancer treated with the anti-PD-1 monoclonal antibody pembrolizumab (Pembro; MK-3475) in KEYNOTE-012*. Journal of Clinical Oncology, 2015. **33**(3_suppl): p. 3-3.
38. Shitara, K., et al., *Efficacy and safety of pembrolizumab or pembrolizumab plus chemotherapy vs chemotherapy alone for patients with first-line, advanced gastric cancer: the KEYNOTE-062 phase 3 randomized clinical trial*. JAMA oncology, 2020. **6**(10): p. 1571-1580.
39. Janjigian, Y.Y., et al., *First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial*. The Lancet, 2021. **398**(10294): p. 27-40.
40. Liu, Y.T. and Z.J. Sun, *Turning cold tumors into hot tumors by improving T-cell infiltration*. Theranostics, 2021. **11**(11): p. 5365-5386.
41. Kim, T.S., et al., *Intratumoral Immune Response to Gastric Cancer Varies by Molecular and Histologic Subtype*. Am J Surg Pathol, 2019. **43**(6): p. 851-860.
42. Kopp, C., et al., *1430P Frequency of PD-L1 positivity and microsatellite instability (MSI) in the DANTE trial: perioperative atezolizumab with FLOT versus FLOT alone in patients with resectable esophagogastric adenocarcinoma. a randomized, open-label phase IIb trial of the German gastric group at the AIO and SAKK*. Annals of Oncology, 2021. **32**: p. S1069-S1070.
43. Huang, X., et al., *Immunogenic chemotherapy: great potential for improving response rates*. Frontiers in Oncology, 2023. **13**.
44. Xuan, S.-H., et al., *Roles of cancer stem cells in gastrointestinal cancers*. World Journal of Stem Cells, 2023. **15**(4): p. 209.
45. Kurtulus, S., et al., *TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells*. J Clin Invest, 2015. **125**(11): p. 4053-62.
46. Hasan, M.M., et al., *Implication of TIGIT(+) human memory B cells in immune regulation*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 1534.
47. He, W., et al., *CD155/TIGIT signaling regulates CD8+ T-cell metabolism and promotes tumor progression in human gastric cancer*. Cancer research, 2017. **77**(22): p. 6375-6388.
48. Xu, D., et al., *TIGIT and PD-1 may serve as potential prognostic biomarkers for gastric cancer*. Immunobiology, 2020. **225**(3): p. 151915.
49. Chu, X., et al., *Co-inhibition of TIGIT and PD-1/PD-L1 in cancer immunotherapy: mechanisms and clinical trials*. Molecular cancer, 2023. **22**(1): p. 93.
50. Hiraoka, N., Y. Ino, and R. Yamazaki-Itoh, *Tertiary Lymphoid Organs in Cancer Tissues*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 244.
51. Yasutomi, M., et al., *CD226 and TIGIT Cooperate in the Differentiation and Maturation of Human Tfh Cells*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 840457.
52. Zhang, Q. and S. Wu, *Tertiary lymphoid structures are critical for cancer prognosis and therapeutic response*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 1063711.
53. Hennequin, A., et al., *Tumor infiltration by Tbet+ effector T cells and CD20+ B cells is associated with survival in gastric cancer patients*. Oncoimmunology, 2016. **5**(2): p. e1054598.

54. Kang, W., et al., *Tertiary Lymphoid Structures in Cancer: The Double-Edged Sword Role in Antitumor Immunity and Potential Therapeutic Induction Strategies*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 689270.
55. Joshi, N.S., et al., *Regulatory T Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Suppress Anti-tumor T Cell Responses*. *Immunity*, 2015. **43**(3): p. 579-90.
56. Sivori, S., et al., *NK cells and ILCs in tumor immunotherapy*. *Molecular aspects of medicine*, 2021. **80**: p. 100870.
57. Du, Y. and Y. Wei, *Therapeutic potential of natural killer cells in gastric cancer*. *Frontiers in immunology*, 2019. **9**: p. 422743.
58. Xia, P. and X.Y. Xu, *DKK3 attenuates the cytotoxic effect of natural killer cells on CD133(+) gastric cancer cells*. *Mol Carcinog*, 2017. **56**(7): p. 1712-1721.
59. Szkaradkiewicz, A., et al., *Natural killer cell cytotoxicity and immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta1) in patients with gastric cancer*. *J Biomed Biotechnol*, 2010. **2010**: p. 901564.
60. Sordo-Bahamonde, C., et al., *Mechanisms of Resistance to NK Cell Immunotherapy*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(4).
61. Liu, X.-S., et al., *Regulatory T cells promote overexpression of Lgr5 on gastric cancer cells via TGF-beta1 and confer poor prognosis in gastric cancer*. *Frontiers in immunology*, 2019. **10**: p. 1741.
62. Kamei, R., et al., *Expression levels of UL16 binding protein 1 and natural killer group 2 member D affect overall survival in patients with gastric cancer following gastrectomy*. *Oncol Lett*, 2018. **15**(1): p. 747-754.
63. Ferretti, E., et al., *Role of the Main Non HLA-Specific Activating NK Receptors in Pancreatic, Colorectal and Gastric Tumors Surveillance*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(12).
64. Li, T., et al., *Gastric cancer cells inhibit natural killer cell proliferation and induce apoptosis via prostaglandin E2*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(2): p. e1069936.
65. Peng, L.-s., et al., *Tumor-associated monocytes/macrophages impair NK-cell function via TGFβ1 in human gastric cancer*. *Cancer immunology research*, 2017. **5**(3): p. 248-256.
66. Chen, J., et al., *Function and subsets of dendritic cells and natural killer cells were decreased in gastric cancer*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. **7**(11): p. 8304-11.
67. Han, B., et al., *Altered NKp30, NKp46, NKG2D, and DNAM-1 Expression on Circulating NK Cells Is Associated with Tumor Progression in Human Gastric Cancer*. *J Immunol Res*, 2018. **2018**: p. 6248590.
68. Cózar, B., et al., *Tumor-infiltrating natural killer cells*. *Cancer discovery*, 2021. **11**(1): p. 34-44.
69. Liu, Y., et al., *Increased expression of programmed cell death protein 1 on NK cells inhibits NK-cell-mediated anti-tumor function and indicates poor prognosis in digestive cancers*. *Oncogene*, 2017. **36**(44): p. 6143-6153.
70. Izawa, S., et al., *H(2)O(2) production within tumor microenvironment inversely correlated with infiltration of CD56(dim) NK cells in gastric and esophageal cancer: possible mechanisms of NK cell dysfunction*. *Cancer Immunol Immunother*, 2011. **60**(12): p. 1801-10.

71. Zhang, Q., et al., *Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity*. Nat Immunol, 2018. **19**(7): p. 723-732.
72. Pesce, S., et al., *PD/1-PD-Ls Checkpoint: Insight on the Potential Role of NK Cells*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1242.
73. Della Chiesa, M., et al., *Features of Memory-Like and PD-1(+) Human NK Cell Subsets*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 351.
74. Abdolahi, S., et al., *Adaptive NK Cell Therapy Modulated by Anti-PD-1 Antibody in Gastric Cancer Model*. Front Pharmacol, 2021. **12**: p. 733075.
75. André, P., et al., *Anti-NKG2A mAb is a checkpoint inhibitor that promotes anti-tumor immunity by unleashing both T and NK cells*. Cell, 2018. **175**(7): p. 1731-1743. e13.
76. Sabins, N.C., et al., *TIM-3 Engagement Promotes Effector Memory T Cell Differentiation of Human Antigen-Specific CD8 T Cells by Activating mTORC1*. J Immunol, 2017. **199**(12): p. 4091-4102.
77. Felices, M., et al., *Continuous treatment with IL-15 exhausts human NK cells via a metabolic defect*. JCI Insight, 2018. **3**(3).
78. Hasan, M.F., et al., *TIGIT Expression on Activated NK Cells Correlates with Greater Anti-Tumor Activity but Promotes Functional Decline upon Lung Cancer Exposure: Implications for Adoptive Cell Therapy and TIGIT-Targeted Therapies*. Cancers (Basel), 2023. **15**(10).
79. Bjornson, Z.B., G.P. Nolan, and W.J. Fantl, *Single-cell mass cytometry for analysis of immune system functional states*. Current opinion in immunology, 2013. **25**(4): p. 484-494.
80. Iyer, A., A.A. Hamers, and A.B. Pillai, *CyTOF® for the Masses*. Frontiers in immunology, 2022. **13**: p. 815828.
81. Spitzer, M.H. and G.P. Nolan, *Mass cytometry: single cells, many features*. Cell, 2016. **165**(4): p. 780-791.
82. Catakovic, K., et al., *TIGIT expressing CD4+ T cells represent a tumor-supportive T cell subset in chronic lymphocytic leukemia*. Oncoimmunology, 2018. **7**(1): p. e1371399.

7. RINGRAZIAMENTI

Vorrei innanzitutto ringraziare la Prof.ssa Chiara Vitale e la Dott.ssa Laura Damele che mi hanno permesso di frequentare l'ambiente di laboratorio e mi hanno assistito con gentilezza e professionalità, rendendo didattico ogni nostro incontro.

Ringrazio anche la Prof.ssa Lucia Del Mastro, la Dott.ssa Annamaria Pessino e il Dott. Fabio Catalano che mi hanno permesso di frequentare gli ambulatori di oncologia.

Ringrazio tutta l'equipe dell'UO Oncologia Medica I e dell'UO Patologia e immunologia sperimentale per l'accoglienza mostrata.

È stato un lungo percorso, un mix di emozioni molto forti, dove sicuramente nella maggior parte dei casi ha preso il sopravvento l'ansia, la paura, a volte anche la delusione, ma ci sono stati molti momenti di soddisfazione e di felicità. Questo percorso ha confermato e rafforzato quel desiderio di voler aiutare il prossimo che mi ha spinto a studiare medicina e per questo vorrei ringraziare il me stesso di 6 anni fa per aver preso questa decisione. Di certo, in ogni passo avanti che facevo e in ogni ostacolo che incontravo sul mio cammino, non ero da solo ma c'era sempre qualcuno pronto a sostenermi dandomi la carica per superare anche l'ostacolo successivo.

Il mio primo pensiero va alla mia famiglia, mia mamma Romina, mio papà Gianluca e mia sorella Ilenia, sicuramente i miei più grandi sostenitori, che mi hanno fatto sempre sentire soddisfatto dei miei risultati, anche quelle volte in cui magari quell'esame non è andato benissimo. Ringrazio di avere una famiglia come voi. Vi voglio un bene immenso, anche se spesso non so come esprimerlo, ed è per il vostro supporto e per mille altri motivi che vi dico GRAZIE.

Un altro forte GRAZIE va ai miei amici, Elisa, Cecilia, Deborah, Bhuna e Giada, il mio cinco cinco cinco, la mia gasolina di spensieratezza nei momenti in cui mi sentivo stremato dallo studio e avevo bisogno di staccare la mente.

Un GRAZIE va a Dario, che in questi anni mi ha aiutato a riscoprire e accettare me stesso, senza che perdessi di vista i miei obiettivi.

Un GRAZIE va a Nasir, che mi ha sopportato tutti i giorni negli ultimi anni, anche nei miei momenti di "delirio" dettati dallo stress.

GRAZIE a tutti coloro che hanno creduto in me, parenti, amici, vicini, conoscenti.

GRAZIE anche a chi non c'è più, i miei nonni, che avrei voluto vicino a me in questo traguardo importante.

Infine, ringrazio i miei colleghi e compagni di avventura e in particolare Jasmine, con cui ho condiviso questo percorso dai primi giorni, lezione dopo lezione, esame dopo esame, pranzo in mensa dopo pranzo in mensa, fino al giorno stesso della discussione di laurea.