

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN

Medicina Veterinaria

Caratterizzazione immunoistochimica del microambiente immunitario dei sarcomi dei tessuti molli del cane

Immunohistochemical characterization of the immune microenvironment of canine soft tissue sarcomas

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa Benedetta Passeri

Correlatore: Chiar.ma Prof.ssa Anna Maria Cantoni

> Laureando: Sergio Minesso

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

Sommario

ABSTRACT	5
RIASSUNTO	6
NERONIZIONE	-
IN I RODUZIONE	<u>1</u>
SARCOMI DEI TESSUTI MOLLI	7
EPIDEMIOLOGIA ED EZIOLOGIA	7
CLASSIFICAZIONE E COMPORTAMENTO BIOLOGICO	
FATTORI PROGNOSTICI	
ASPETTI COMPARTIVI	
MICROAMBIENTE IMMUNITARIO TUMORALE	
ASPETTI GENERALI DEL MICROAMBIENTE IMMUNITARIO TUMORALE	
CELLULE DENDRITICHE	
MACROFAGI ASSOCIATI AL TUMORE (TAMS)	
LINFOCITI INFILTRANTI IL TUMORE (TILS)	
STRUTTURE LINFOIDI TERZIARIE (TLSS)	
MICROAMBIENTE IMMUNITARIO DEI SARCOMI DEI TESSUTI MOLLI	
SCOPO DELLO STUDIO	
MATERIALI E METODI	
SELEZIONE DEI CAMPIONI	
COLORAZIONE CON EMATOSSILINA EOSINA	
REVISIONE E GRADING	
IMMUNOISTOCHIMICA	
QUANTIFICAZIONE DELLE IMMUNO-POSITIVITÀ	
DATI E ANALISI STATISTICA	
RISULTATI	
REVISIONE E GRADING	
IMMUNOISTOCHIMICA	
MACROFAGI M1 MAC387+	

LINFOCITI B CD20+	
PLASMACELLULE MUM-1+	
LINFOCITI T CD3+	
LINFOCITI T REGOLATORI FOXP3+	
CORRELAZIONE TRA CELLULE IMMUNITARIE	
CORRELAZIONE TRA CELLULE IMMUNITARIE E INDICATORI PROGNOSTICI	
DISCUSSIONE	
CONCLUSIONI	57
BIBLIOGRAFIA	<u>58</u>

Abstract

Soft tissue sarcomas (STS) represent a heterogeneous group of mesenchymal neoplasms and account for 8% to 18% of canine cutaneous tumors. It is estimated that 95,000 cases of STS are diagnosed in dogs in the United States annually, with a mortality rate ranging from 20% to 30%. Surgical removal with wide margins is often curative, but local recurrence and metastasis can occur depending on the histological grade. STS are traditionally considered immunologically "cold" tumors, and the use of immune checkpoint inhibitors (ICIs) for the treatment of human STS has yielded disappointing results. Data regarding human STS indicate that tumor-associated macrophages (TAMs) are the most abundant cell type in the tumor microenvironment (TME) of these neoplasms. STS characterized by high infiltration of B lymphocytes, T lymphocytes, and the formation of tertiary lymphoid structures (TLSs) have a more favorable prognosis and respond better to ICIs treatment. Literature regarding the TME of canine STS is extremely limited, and there are no studies examining its cellular populations. Given the high incidence and numerous similarities with the human counterpart, dogs could represent a valuable spontaneous model for studying the TME of STS. Thirty-one canine STS (15 perivascular wall tumors, 4 peripheral nerve sheath tumors, 4 liposarcomas, 4 fibrosarcomas, 1 myxosarcoma, and 3 undifferentiated sarcomas) were reviewed, graded, and analyzed using immunohistochemistry to identify CD3+, CD20+, MUM-1+, Foxp3+, and MAC387+ cells. M1 TAMs showed a widespread distribution within the neoplastic tissue, while tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) were primarily observed near tumor vasculature. Although canine STS generally exhibited low immunogenicity, some cases were characterized by varying degrees of infiltration of immune cells with antitumor function. The density of M1 TAMs showed a positive correlation with the density of B lymphocytes and plasma cells, suggesting that M1 TAMs condition the genesis of an effective antitumor immune response in canine STS. The presence of infiltrating regulatory T cells (Treg) suggests that these may represent a possible mechanism of immune evasion in these neoplasms. STS characterized by high infiltration of immune cells were distinguished by the presence of dense lymphocytic aggregates with a follicle-like structure interpreted as TLSs. No significant differences were found in the TME composition among STS of different grades or histotypes, and no correlations were observed with the mitotic index. These results are consistent with knowledge about human STS and support the potential use of canine STS as a spontaneous model for studying the TME of these neoplasms and developing new therapeutic approaches for both species.

Riassunto

I sarcomi dei tessuti molli (STS) rappresentano un gruppo eterogeneo di neoplasie di origine mesenchimale e costituiscono dall'8 al 18% delle neoplasie cutanee del cane. Si stima che ogni anno negli Stati Uniti vengano diagnosticati 95.000 casi di STS nella popolazione canina con una mortalità che va dal 20% al 30%. La rimozione chirurgica ad ampi margini è spesso risolutiva, ma la recidiva locale e lo sviluppo di metastasi possono presentarsi dipendentemente dal grado istologico. I STS sono tradizionalmente considerati tumori immunologicamente "freddi" e l'impiego di inibitori dei checkpoint immunitari (ICIs) per il trattamento dei STS dell'uomo ha restituito risultati deludenti. Dati in merito ai STS dell'uomo indicano che i macrofagi associati al tumore (TAMs) rappresentano la tipologia cellulare più numerosa nel microambiente tumorale (TME) di queste neoplasie e che tumori caratterizzati da un'elevata infiltrazione di linfociti B, linfociti T e dalla formazione di strutture linfoidi terziarie (TLSs) presentano una prognosi più favorevole e una migliore risposta al trattamento con ICIs. La letteratura in merito al TME dei STS del cane è estremamene limitata e non sono disponili ricerche che ne studino le popolazioni cellulari. Data l'elevata incidenza e le numerose somiglianze con la controparte umana, il cane potrebbe rappresentare un valido modello spontaneo per lo studio del TME dei STS. Trentuno STS del cane (15 PWT, 4 PNST, 4 LS, 4 FSA, 1 MS e 3 US) sono stati revisionati, gradati e analizzati mediante IHC per l'identificazione delle cellule CD3+. CD20+, MUM-1+, Foxp3+ e MAC387. I TAMs M1 hanno mostrato una distribuzione diffusa all'interno del tessuto neoplastico, mentre i TILs sono stati osservati principalmente in sede perivascolare. Sebbene i STS del cane abbiano presentato generalmente una scarsa immunogenicità, alcuni casi sono stati caratterizzati da un'infiltrazione più o meno abbondante di cellule immunitarie con funzione antitumorale. La densità dei TAMs M1 ha mostrato una correlazione positiva con la densità di linfociti B e plasmacellule suggerendo che i TAMs condizionino la genesi di un'efficace risposta immunitaria antitumorale nei STS del cane. L'osservazione di linfociti T regolatori infiltranti i STS consente di ipotizzare che questi possano rappresentare un possible meccanismo di evasione immunitaria in queste neoplasie. I STS caratterizzati da un'elevata infiltrazione di cellule immunitarie si sono distinti per la presenza di densi aggregati linfocitari con una struttura simil follicolare interpretate come TLSs. Non sono state individuate differenze significative nella composizione del TME di STS di diverso grado o istotipo e non sono state osservate correlazioni con l'indice mitotico. Tali risultati sono compatibili con le conoscenze in merito ai STS dell'uomo e supportano il potenziale impiego dei STS del cane come modello spontaneo per lo studio del TME di queste neoplasie e lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici a favore di entrambe le specie.

Introduzione

Sarcomi dei tessuti molli

Epidemiologia ed eziologia

I sarcomi dei tessuti molli (STS) rappresentano dall'8 al 18% delle neoplasie cutanee del cane [1]-[4]. L'incidenza annuale stimata va dai 35 ai 122 casi su 100.000 cani a seconda degli studi [2], [5]-[7]. Non sono state identificate predisposizioni di sesso [7]. Si osserva una maggiore prevalenza nei cani di età avanzata e sembrano essere maggiormente interessati i cani di mediagrossa taglia [2], [3]. Il Golden Retriever ed il Labrador Retriever mostrano una predisposizione in diversi studi [3], [4], [8], [9]. Si stima che ogni anno negli Stati Uniti vengano diagnosticati approssimativamente 95.000 casi di STS nella popolazione canina con una mortalità che va dal 20% al 30% [10]. I siti anatomici maggiormente coinvolti sono gli arti (fino al 60% dei casi), seguiti dal tronco (35% dei casi) e dalla testa (5%) [2], [11], [12]. Uno studio recente condotto su 1435 casi di neoplasie cutanee indica che i STS rappresentano fino al 43% delle neoplasie cutanee dell'arto anteriore, il 30% dell'arto posteriore, il 26% delle regioni del petto e del piede posteriore, il 14% della testa, il 12,5% del collo, il 12,5% del piede anteriore e il 9% del dorso [4]. L'oncogenesi dei STS del cane non è stata del tutto chiarita [7]. L'infiammazione cronica sembra essere coinvolta nella genesi e progressione di alcuni sarcomi negli animali domestici [7], [13]. Questo dato è avvalorato da singoli casi di STS sviluppatisi a seguito di traumi, al posizionamento di impianti ortopedici e all'esposizione a radiazioni [2], [14]-[21]. Inoltre, l'infestazione da nematodi della specie Spirocerca Lupi determina la formazioni di noduli infiammatori che evolvono in sarcomi esofagei nel 25% dei cani affetti [22], [23]. Nella specie felina, l'infiammazione cronica associata a corpi estranei e vaccini è alla base dello sviluppo del Fibrosarcoma Felino nel sito di iniezione (FISS) [24]. Anche nel cane, è riportato il ritrovamento di depositi di alluminio all'interno di sarcomi morfologicamente simili ai FISS e localizzati in possibili siti di iniezione [25]. Nell'uomo, i STS vengono suddivisi secondo il profilo molecolare in due gruppi: la maggioranza dei STS dell'uomo presenta un profilo mutazionale complesso caratterizzato da numerose alterazioni genetiche aspecifiche; un gruppo più ristretto include STS per cui sono note specifiche traslocazioni cromosomiche e mutazioni a carico di geni oncogeni [7]. Studi di RNA-seq hanno individuato differenze significative nell'espressione di geni potenzialmente coinvolti nell'oncogenesi delle diverse tipologie STS del cane [10]. Tale distribuzione suggerisce l'assenza di un profilo comune a tutti i STS: l'iniziazione dei STS potrebbe essere un evento casuale, probabilmente esacerbato dall'azione mutagena dall'ambiente infiammatorio locale [7].

Classificazione e comportamento biologico

I STS rappresentano un gruppo eterogeneo di neoplasie di origine mesenchimale. Nel cane, i STS originano più frequentemente a livello cutaneo e sottocutaneo, ma possono svilupparsi dai tessuti connettivi molli di qualsiasi sito anatomico: muscoli, tendini, legamenti, capsule articolari, fasce, nervi e vasi sanguigni [1]. Diverse tipologie tumorali sono state raggruppate nella categoria dei STS in funzione di caratteristiche istologiche comuni e di un comportamento biologico ritenuto simile [1], [2]. Il comportamento biologico dei STS è caratterizzato dalla formazione di masse espansive circondate da una pseudo-capsula formata dalla compressione del tessuto connettivo adiacente [2], [7]. I margini istologici dei STS sono poco definiti e la crescita tende ad infiltrare i piani fasciali [2], [7]. I STS presentano un comportamento localmente aggressivo con un indice di recidiva basso/moderato dopo asportazione chirurgica [2]. La metastatizzazione avviene per via ematogena, ma con un potenziale metastatico basso e dipendente dal grado istologico [2], [7]. Le neoplasie incluse nella categoria dei STS (Tabella 1) sono il fibrosarcoma (FSA), i tumori della parete vascolare (Perivascular Wall Tumor - PWT, precedentemente emangiopericitoma), il liposarcoma (LS), il sarcoma pleomorfo o istiocitoma fibroso maligno (Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma - UPS), il mesenchimoma maligno (MM), il mixosarcoma (MS), il sarcoma indifferenziato (Undifferentiated Sarcoma - US) e i tumori della guaina dei nervi periferici (Peripheral Nerve Sheat Tumor - PNST) ad eccezione di quelli originanti dai plessi brachiale e lombosacrale [1], [2]. Alcune neoplasie mesenchimali con origine nei tessuti molli sono costantemente escluse dalla categoria dei STS poiché facilmente distinguibili sulla base delle caratteristiche istologiche, del sito anatomico di origine o per un comportamento biologico più aggressivo [1]. Quest'ultime includono l'emangiosarcoma (HSA), il sarcoma sinoviale (SS), i tumori stromali gastro-intestinali (GIST), il fibrosarcoma orale e i PNST con origine a livello dei plessi brachiale e lombosacrale. Il rabdomiosarcoma (RMS), il leiomiosarcoma (LMS) ed il linfangiosarcoma vengono inclusi nei STS solo da alcuni autori [1], [2], [7]. Vista la derivazione dalle cellule dendritiche interstiziali CD18+ e il comportamento marcatamente aggressivo, il sarcoma istiocitico (SH) è escluso dai STS [1], [26]. I STS del cane sono morfologicamente accomunati dalla presenza di cellule mesenchimali fusate organizzate in fasci, vortici e flussi accompagnati da una matrice extracellulare di fibre collagene [1]. La classificazione dei STS e l'identificazione dell'istotipo si basa sulla somiglianza con il tessuto adulto di origine e l'identificazione di pattern istologici caratteristici (Tabella 1) [1]. Tuttavia, la tipizzazione dei STS, sia del cane che dell'uomo, è complicata dalla contemporanea presenza di più pattern istologici e dalla condivisione di alcuni pattern tra più entità patologiche [1], [8]. Ad esempio, la distinzione di PWT e PNST è spesso difficile a causa della comunanza di diverse caratteristiche istologiche [27]. Inoltre, lo stesso marker immunoistochimico (IHC) viene espresso da più tipi cellulari e fenotipi [2]. Nella maggioranza dei STS altamente sdifferenziati la classificazione basata sull'osservazione di sezioni colorate con ematossilina-eosina (HE) non è possibile e sono richieste colorazioni di IHC [8]. Vista la difficoltà nella differenziazione fenotipica e nella distinzione delle forme benigne e il basso potenziale metastatico rispetto ad altri sarcomi, alcuni autori suggeriscono che questi tumori dovrebbero essere raggruppati nella definizione di "tumori delle cellule fusate dei tessuti molli" [1], [2]. Tuttavia, sebbene si ritenga che i STS abbiano un comportamento biologico simile, vi sono evidenze crescenti che sostengono l'esistenza di differenze tra gli istotipi [2].

Il fibrosarcoma (FSA) origina da fibrociti e fibroblasti ed è più frequente in cani di età avanzata, ma con un'insorgenza più precoce rispetto ad altri tipi di STS [2]. Golden Retrievers e Dobermann sembrano essere predisposti [2], [28]. I FSA possono originare come masse focali in qualsiasi sito anatomico, ma interessano con maggiore frequenza la testa, gli arti e la cavità orale [2], [28]. Istologicamente, il FSA è caratterizzato dalla presenza di fibroblasti maligni organizzati in fasci intrecciati o a spina di pesce ed immersi in stroma di fibre collagene di quantità variabile [1], [28]. Il fibrosarcoma cheloidale è caratterizzato da matrice extracellulare composta da fibre collagene ialinizzate [28]. I FSA esprimono generalmente solo il marker mesenchimale Vimentina (Vim) [28]. I FSA hanno un comportamento infiltrativo e tendono a recidivare a seguito dell'exeresi chirurgica a margini incompleti [2].



Figura 1: *FSA ben differenziato (colorazione HE; ingrandimento 20X). Notare la caratteristica disposizione delle cellule neoplastiche* fusate in fasci intrecciati o a "spina di pesce".

Il mixosarcoma (MS) è una neoplasia di origine fibroblastica contraddistinta dalla presenza di cellule fusate o stellate immerse in un'abbondante matrice extracellulare di aspetto mixoide-muco polisaccaridico [2], [28]. I MS sono rari e originano solitamente a livello di cute e sottocute di arti e tronco di cani anziani [2]. I MS sembrano presentare un tasso di recidiva locale ed un rischio di metastasi linfonodale maggiore rispetto al gruppo dei STS nel complesso [29].



Figura 2: MS ben differenziato (colorazione HE, ingrandimento 20x). Notare la presenza di cellule neoplastiche di forma fusata o stellata immerse in una matrice extracellulare di aspetto mixoide.

Il sarcoma pleomorfo o istiocitoma fibroso maligno (UPS) è una neoplasia di origine fibroblasticamiofibroblastica che interessa prevalentemente cani di mezza età o anziani senza predisposizioni di sesso. Le razze maggiormente colpite sono il Flat Coated Retriever, il Rottweiler ed il Golden Retriever [2]. I siti d'insorgenza più frequentemente interessati sono il tessuto sottocutaneo di tronco ed arti e la milza [2]. La classificazione istologica nell'uomo divide il UPS nei sottotipi storiforme-pleomorfo, a cellule giganti, mixoide e infiammatorio, ma solo le prime due sono riportate negli animali domestici [2], [28]. La variante storiforme-pleomorfa è la più comune ed è caratterizzata dalla presenza di cellule fibroblastiche disposte "a ruota di carro" miste a cellule di morfologia istiocitoide e infiltrati infiammatori con linfociti, plasmacellule, granulociti neutrofili ed eosinofili [28]. La variante a cellule giganti vede la presenza di numerose cellule multinucleate giganti miste a cellule con fenotipo fibrolastico e cellule istiocitoidi [28]. L'immunofenotipo delle cellule si contraddistingue per la costante positività alla vimentina, per l'espressione variabile di marker muscolari quali actina e desmina e per la negatività al CD18. Tale immunofenotipo è condiviso anche dalle cellule giganti del UPS [2], [28]. I UPS tendono ad essere più frequentemente di alto grado rispetto al gruppo dei STS [2]. Inoltre, si riscontra una maggiore frequenza di metastasi al momento della diagnosi. I UPS a cellule giganti presentano un elevato potenziale di dare metastasi a sottocute, linfonodi, fegato e polmoni [2].

Il mesenchimoma maligno (MM) rappresenta un infrequente neoplasia con istogenesi incerta, data la presenza di cellule mesenchimali multiple dei tessuti molli immerse in matrice osteoide, condroide o di fibre collagene [2]. I MM possono originare a livello cardiaco, polmonare, della parete toracica, del fegato, della milza, dei reni e delle dita [2]. I MM tendono ad avere una crescita lenta e a raggiungere dimensioni molto grandi [2].

Il liposarcoma (LS) è una neoplasia di origine lipocitico-lipoblastica infrequente [2], [28]. I LS originano in cani anziani con una predilezione per i Pastori dello Shetland [28]. I LS non originano dalla trasformazione maligna di lipomi [2]. I siti anatomici maggiormente interessati sono il tessuto sottocutaneo di addome ed arti, ma sono riportate come sedi primarie anche l'osso, la milza e la cavità addominale [2]. I LS sono classificati istologicamente in ben differenziato, mixoide, a cellule rotonde (scarsamente differenziato) e pleomorfo (sdifferenziato) [2]. Nel LS ben differenziato la maggior parte delle cellule neoplastiche presentano un fenotipo adipocitico caratterizzato singolo vacuolo lipidico ed un nucleo periferico [28]. Il LS pleomorfo (liposarcoma anaplastico) si caratterizza da una morfologia cellulare molto variabile e dalla presenza di cellule multinucleate con elevato pleomorfismo nucleare. In quest'ultimo caso la diagnosi di LS si basa sull'osservazione di vacuoli lipidici intracitoplasmatici presenti in una piccola percentuale delle cellule neoplastiche [28]. La variante mixoide del LS è distinguibile per la presenza di cellule con morfologia fusata, lipociti e lipoblasti immersi in una matrice extracellulare lassa e di aspetto mucoide-mixoide [28]. Uno studio recente basato sull'espressione IHC di MDM2 e CDK4 ha individuato il LS sdifferenziato come un'entità patologica a sé stante, analogamente a quanto si riscontra nei LS dell'uomo [30]. I LS hanno un elevato potere invasivo locale ed un basso potenziale metastatico. Le metastasi si osservano con maggiore frequenza nella variante del LS pleomorfo e colpiscono prevalentemente polmoni, fegato, milza e tessuto osseo [2].



Figura 3: LS ben differenziato (colorazione HE; ingrandimento 20X). Notare la morfologia delle cellule neoplastiche caratterizzata dalla presenza di uno o più vacuoli otticamente vuoti.

I tumori della parete vascolare (PWT) sono un gruppo di neoplasie derivanti dalle diverse tipologie cellulari che costituiscono la parete dei vasi sanguini, ad eccezione dell'endotelio [2], [28]. Questo l'emangiopericitoma, raggruppamento include il miopericitoma, l'angioleiomioma, l'angiomiofriboblastoma e l'angiofibroma [28]. Questi tumori sono caratterizzati dalla presenza di proteine contrattili, con un'espressione che aumenta progressivamente dai periciti ai miopericiti fino ai miociti muscolari lisci sub-endoteliali. Da un punto di vista istologico, i PWT sono contraddistinti dalla presenza di cellule fusate organizzate in vortici intorno a piccole strutture vascolari, soprattutto nel miopericitoma [28]. In altri sottotipi di PWT sono osservabili i pattern a corna di cervo e placentoide [28]. La distinzione istologica di PWT e PNST è spesso complicata dalla presenza di aree con elevata o bassa densità cellulare che mimano i pattern Antoni A, Antoni B ed i corpi di Verocay [27], [28], [31]. I PWT possono essere caratterizzati mediante la loro variabile positività in IHC a proteine contrattili quali actina del muscolo liscio (SMA), calponina, pan-actina e desmina [28]. Alcuni sottotipi di PWT esprimono la liscina e caldesmone catena pesante [2], [32]. I PWT possono occasionalmente esprimere S100; tuttavia, diversi studi descrivono la scarsa specificità di questo marker nella tipizzazione delle neoplasie del cane [31]. I PWT presentano un comportamento biologico meno aggressivo e recidive più rare rispetto agli altri istotipi raggruppati nei STS [2]. L'escissione completa è spesso curativa e l'escissione incompleta può essere curativa per i tumori di grado basso [28].



Figura 4: *PWT ben differenziato (colorazione HE, ingrandimento 10x). Notare la caratteristica disposizione delle cellule neoplastiche a vortice perivascolare.*

I tumori delle guaine dei nervi (PNST) originano dalle cellule della guaina nervosa quali cellule di Schwann, cellule perineurali e fibroblasti perineurali o endoneurali [2]. Il gruppo dei PNST comprende sia entità benigne che maligne ben distinte [2]. Le prime, rappresentate da schwannomi, perineuriomi e neurofibromi, tendono ad essere ben circoscritti, localizzati a livello cutaneo e caratterizzati dalla presenza di cellule fusate organizzate in fasci, palizzate e vortici organizzate nei pattern di Antoni A e Antoni B [2], [27], [28]. La formazione dei c.d. corpi di Verocay, tipica degli schwannomi dell'uomo, si riscontra più raramente negli animali [28]. I PNST maligni (MPNST) sono raggruppati in un'unica categoria e presentano le medesime caratteristiche istologiche delle forme benigne ma con una maggiore densità cellulare e l'assenza di palizzate [28]. I MPNST si localizzano spesso a livello sottocutaneo e tendono ad invadere i tessuti più profondi [2]. Non esistono studi mirati a validare l'associazione delle caratteristiche istologiche di malignità ed il comportamento biologico nei PNST [1]. La distinzione tra PWT e PNST è spesso complicata dalla condivisione di pattern istologici caratteristici tra le due entità [27], [31]. I marker IHC più utili nella diagnosi di PNST sono S100, la proteina acida fibrillare gliale (GFAP), il recettore del fattore di crescita neuronale (NGFR), l'enolasi neurone-specifica (NSE) e la laminina (LAM) [2], [28]. Studi recenti suggeriscono che l'utilizzo di LAM e SOX-10 e periaxina-1 possa consentire più facilmente la distinzione tra PWT e PNST [27].



Figura 5: *PNST ben differenziato (colorazione HE; ingrandimento 20x). Notare l'organizzazione delle cellule neoplastiche con nuclei disposti in palizzate alternate ad aree anucleate (Corpi del Verocay).*

Tipo	Istogenesi	Fenotipo	Pattern istologici	Caratteristiche IHC
FSA	Tessuto fibroso	Fibroblasti, fibrociti	Fasci intrecciati, pattern a spina di pesce, stroma collagenoso	
			pronunciato	
KFSA	Tessuto fibroso	Fibroblasti, fibrociti	Stroma collagenoso ialino	
MS	Tessuto fibroso	Fibroblasti, fibrociti	Cellule stellate o fusate in una matrice mucinosa	
UPS	Tessuto fibroso	Fibroblasti,	Cellule fibroblastiche e cellule giganti multinucleate organizzate in	
		miofibroblasti	pattern storiforme e associate a cellule infiammatorie	
LS	Tessuto adiposo	Adipociti	Cellule poligonali con citoplasma vacuolizzato	
PWT	Parete vascolare	Periciti, miopericiti,	Pattern di crescita vascolare: a corna di cervo, placentoide, a vortici	Calponina, Pan actina,
		miociti lisci	perivascolari e a fasci dalla tonaca	SMA,
PNST	Nervi periferici	Cellule di Schwann,	Fasci intrecciati, vortici attorno a fibre collagene, Pattern di an Antoni	NSE, S100,
		neurofibroblasti	A e Antoni B	Neurofilamento, NGFR,
				Mioglobina, GFAP
MM	Tessuto	Tipi cellulari multipli	Cellule di diverse tipologie mesenchimali e matrice extracellulare	Lisozima, MHCII,
	mesenchimale		condroide, osteoide o collagenosa	Desmina
LMS	Tessuto	Leiomioblasti,	Nuclei a sigaro, citoplasma prominente	SMA, Desmina,
	muscolare liscio	leiomiociti		Calponina
RMS	Tessuto	Mioblasti scheletrici,	Cellule a racchetta, striature citoplasmatiche	Mioglobina, Desmina,
	muscolare striato	miociti scheletrici		NSE, GFAP, S100

 Tabella 1: principali caratteristiche dei STS del cane [1]

Fattori prognostici

I STS si presentano come masse con crescita infiltrativa e margini istologici scarsamente definiti [7]. In medicina veterinaria, l'escissione chirurgica ad ampi margini (fino a 3cm) è tradizionalmente considerata l'opzione terapeutica migliore [7]. Tuttavia, la recidiva locale a seguito della rimozione chirurgica si presenta in una percentuale di pazienti dal 7% al 75% e lo sviluppo di metastasi interessa dal 7% al 41% dei casi [7]. Si stima che dal 20% al 30% dei cani affetti da STS muoiano a causa della malattia [7]. Numerosi studi hanno evidenziato l'impatto prognostico di diversi fattori nei STS del cane [1]. Tuttavia, la maggior parte delle informazioni circa i fattori prognostici dei STS deriva da studi mirati a scopi diversi quali la comparazione di più approcci terapeutici [1]. Inoltre, tali studi sono spesso limitati dalla dimensione ridotta della popolazione in esame, dalla mancanza di una diagnosi istologica rigorosa e dalla scarsa precisione nella stima del tasso di metastasi o di recidiva locale [1], [7]. In più, diversi studi hanno incluso entità patologiche caratterizzate da un comportamento biologico marcatamente più aggressivo quali il sarcoma istiocitico, l'emangiosarcoma, il leiomiosarcoma ed il sarcoma delle cellule sinoviali [1]. Un ulteriore limite di questi studi è legato alla loro natura retrospettiva [1]. I fattori prognostici dei STS maggiormente validati includono sia caratteristiche istologiche che macroscopiche. Le prime sono il tipo istologico, il grado e l'indice mitotico; le seconde comprendono le dimensioni, la localizzazione e le caratteristiche alla palpazione del tumore [1], [7]. Inoltre, anche la completezza dei margini di escissione chirurgica ha un ruolo prognostico significativo [7]. Nessuno dei fattori precedentemente elencati, se preso singolarmente, è in grado di prevedere l'esito di un STS in modo soddisfacente [1].

Vi sono evidenze secondo cui i singoli istotipi di STS dell'uomo presentano un comportamento diverso per quanto riguarda l'invasività locale, il potenziale metastatico e la recidiva locale [1], [7]. I STS del cane vengono tradizionalmente considerati come un gruppo ai fini prognostici [7]. Tuttavia, anche nel cane, vi sono prove che sostengono l'esistenza di differenze nella presentazione e nell'esito dei diversi istotipi di STS [2]. È da sottolineare che gli studi mirati ad individuare differenze nell'esito dei diversi tipi di STS sono limitati dalle dimensioni ristrette della popolazione in esame o dalla scarsa rappresentatività derivante dalla rarità di determinati istotipi come il LS e il UPS [1], [7]. Inoltre, la difficoltà nel distinguere istologicamente i diversi tipi di STS e di separare le forme benigne da quelle maligne complica la comprensione del ruolo prognostico dell'istotipo nei STS [1], [7]. Uno studio retrospettivo basato su 350 casi di STS ha riportato un tasso di recidiva locale del 20,8% e un tasso metastatico del 11,4%. Lo stesso studio evidenzia una maggiore propensione di recidiva locale nel neuro-fibrosarcoma (32%), seguito dal

mixoma (30,7%) e dal fibrosarcoma (28,6%) [33]. Diverse fonti attribuiscono ai PWT un comportamento biologico poco o non aggressivo rispetto agli altri tipi di STS, contraddistinto da un tasso di recidiva locale ed un potenziale metastatico basso [7], [32], [33]. Sembra che le differenze nel comportamento degli istotipi possa essere spiegato da una maggiore propensione di alcune tipologie a presentarsi con un grado e/o un indice mitotico (mitosi in 10 campi HPF) elevati [1]. Attualmente, il tipo istologico ha uno scarso impatto sulla gestione clinica dei singoli casi di STS [1].

Il grado istologico è ritenuto il fattore prognostico più significativo nei STS dell'uomo [1]. Il sistema di grading istologico dei STS del cane deriva da uno dei sistemi utilizzati per i STS dell'uomo sviluppato da Trojani et al. e conosciuto come French grading system [1], [34]. Tale sistema è stato applicato ai STS del cane per la prima volta da Kuntz et al. e oggi è il parametro istologico maggiormente impiegato per la definizione della prognosi dei STS [34], [35]. Il grading dei STS classifica i casi in grado I (basso), grado II (intermedio) e grado III (alto) combinando tre caratteristiche istologiche quali la differenziazione, la percentuale di necrosi e l'indice mitotico (MI) [1], [7]. Più studi retrospettivi dimostrano un'associazione tra il grado dei STS, la sopravvivenza globale e la recidiva locale, ma non sono disponibili dati consistenti circa l'impatto del grado sul potenziale metastatico [33], [34], [36]. Tuttavia, la probabilità di recidiva locale è fortemente condizionata dalla completezza dei margini chirurgici e pertanto il grado non può essere considerato come unico fattore prognostico per la recidiva [34]. I STS di basso grado sono quelli più frequentemente riscontrati nel cane e presentano la probabilità più bassa di determinare recidiva dopo l'escissione anche quando i margini chirurgici sono vicini alla neoplasia [1]. I STS di grado intermedio si osservano meno frequentemente di quelli di basso grado rispetto ai quali presentano una maggiore propensione alla recidiva locale quando i margini escissionali sono vicini alla neoplasia [1], [36]. I STS di grado alto sono i meno frequenti (dal 7 al 17% dei STS cutanei e sottocutanei) e sono caratterizzati dal più elevato tasso di recidiva e potenziale metastatico [1]. Anche nel caso di STS di alto grado la recidiva dopo l'escissione completa è infrequente [1], [36]. Ciò spinge a considerare lo stato istologico dei margini come il fattore prognostico di maggiore rilevanza per la recidiva locale [34].

Il grado istologico dei STS del cane prende in considerazione la differenziazione, la necrosi e l'indice mitotico [1]. La differenziazione è misura della somiglianza del tessuto neoplastico al normale tessuto mesenchimale di derivazione [1]. I tumori ben differenziati sono quelli che somigliano maggiormente al normale tessuto mesenchimale e per cui è possibile determinare l'istotipo per la presenza di pattern istologici caratteristici [1]. I STS scarsamente differenziati presentano una somiglianza modesta con il tessuto mesenchimale da cui derivano, ma è comunque possibile identificare l'istotipo [1]. Per i STS indifferenziati non è possibile identificare il tessuto mesenchimale di derivazione [1]. Ciò non si applica nei casi in cui l'istogenesi di un tumore è difficilmente determinabile per la condivisione dei medesimi pattern istologici tra più tipologie come nel caso di PWT e PNST [1]. L'estensione della necrosi deve essere valutata differenziando quest'ultima da aree emorragiche, mixoidi o ialine ed escludendo le alterazioni associate all'asportazione chirurgica. L'indice mitotico è definito come il numero di mitosi contate in 10 HPF e deve essere misurato nell'area con la maggiore densità cellulare e con l'attività mitotica maggiore [1]. Sembra che solamente la necrosi e l'indice mitotico siano elementi statisticamente significativi ai fini prognostici [1], [35]. Inoltre, il livello di differenziazione risulta essere caratterizzato da una elevata soggettività quando valutato da più patologi [35]. Al contrario, l'indice mitotico risulta essere predittivo per lo sviluppo di metastasi, il tempo di sopravvivenza e la recidiva locale e l'estensione della necrosi ha un valore predittivo per quanto riguarda il tempo di sopravvivenza a seguito della chirurgia [35].

L'indice mitotico può essere considerato un fattore prognostico anche se considerato singolarmente [1]. Un elevato indice mitotico è stato associato a una maggiore propensione alla recidiva ed una maggiore precocità della stessa, allo sviluppo di metastasi e un ad un ridotto tempo di sopravvivenza [1]. Inoltre, l'espressione di marker specifici della proliferazione cellulare quali AgNOR e Ki-67 è stata correlata ad un ridotto tempo di sopravvivenza [1].

Sebbene le dimensioni del tumore possano avere ripercussioni sull'escissione chirurgica, diversi studi non sono stati in grado di dimostrarne il significato prognostico [1]. Altri autori hanno identificato che i STS con dimensioni >5cm presentino un tempo prima della recidiva e un tempo di sopravvivenza globale minori [1], [7]. Analogamente, la localizzazione della neoplasia può condizionare il risultato della rimozione chirurgica [1]. Tuttavia, diversi studi non hanno identificato differenze nel tempo di sopravvivenza o nella recidiva locale tra le diverse localizzazioni [1]. Fanno eccezione i STS con localizzazione orale e periorale in cui è noto un comportamento più aggressivo [1].

Aspetti compartivi

Analogamente alla specie canina, nell'uomo, la definizione di STS comprende numerose ed eterogenee neoplasie mesenchimali maligne con origine a livello dei tessuti molli [37]. La categoria dei STS dell'uomo include oltre 120 istotipi [38]. La prevalenza dei STS nell'uomo è estremamente bassa e rappresenta solamente l'1,5% del totale nelle neoplasie umane. L'incidenza annuale è di 6 casi ogni 100.000 persone [37]. Contrariamente, i STS del cane rappresentano dall'8 al 18% delle neoplasie cutanee e sottocutanee [1]-[4]. L'incidenza annuale nel cane va dai 35 ai 122 casi su 100.000 cani a seconda degli studi [2], [5]-[7]. Ad eccezione dei sarcomi giovanili, anche i STS dell'uomo sono più frequenti nei pazienti anziani [37]. Similmente al cane, nell'uomo, i STS hanno un comportamento localmente aggressivo e la rimozione chirurgica dell'intera massa è il trattamento più appropriato; tuttavia, la recidiva locale e lo sviluppo di metastasi si possono più o meno presentare a seconda dell'istotipo o del grado di malignità [37]. Diversi studi riportano corrispondenza nelle caratteristiche istologiche e nella classificazione dei STS del cane e dell'uomo [39]. Numerose somiglianze sono state riscontrate sia nello schema di classificazione che nelle caratteristiche istologiche e immunoistochimiche dei RMS del cane e dell'uomo [39]. In una ricerca comparativa dei STS non RMS, (PWT, UPS, MS, LS, PNST e LS), le caratteristiche istologiche ed immunoistochimiche osservate nel cane erano simili alla controparte umana [40]. Inoltre, il sistema di grading proposto da Trojani et. al., sviluppato e validato nell'uomo, è un fattore prognostico routinariamente applicato nei STS del cane [37]. Grazie ad un'elevata incidenza di tumori, ad una durata della vita maggiore ed alla condivisione del medesimo ambiente, la specie canina è stata proposta come modello alternativo a quello murino per lo studio di diverse tipologie tumorali dell'uomo [39]. Data l'elevata incidenza e le numerose somiglianze con la controparte umana, il cane potrebbe rappresentare un valido modello spontaneo per lo studio della biologia dei STS e lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici a favore di entrambe le specie [39].

Microambiente immunitario tumorale

Aspetti generali del microambiente immunitario tumorale

Negli ultimi decenni, lo studio dei tumori ha messo in luce come questi presentino una complessità che può essere paragonabile o superare quella dei tessuti sani e che vede la presenza di diversi tipi cellulari specializzati che interagiscono tra loro e con le cellule neoplastiche [41]. Pertanto, la ricerca sulla biologia dei tumori ha dato largo spazio allo studio del c.d. microambiente tumorale (TME) e del suo ruolo nello sviluppo e nella progressione dei tumori [42]. Il TME si compone, oltre che delle cellule neoplastiche, di cellule staminali tumorali, cellule endoteliali, fibroblasti, e varie tipologie di cellule immunitarie comprese nello stroma tumorale [42]. È stato osservato come le cellule immunitarie contenute nel TME possono influenzare l'evoluzione, la crescita la progressione di diverse tipologie tumorali mediante vari meccanismi [42]. Inoltre, la riattivazione della risposta immunitaria antitumorale mediante inibitori dei checkpoint immunitari (ICIs), che ripristinano la funzioni nelle cellule immunitarie nel TME, si è dimostrata un trattamento estremamente valido in diverse tipologie tumorali dell'uomo [38]. Le cellule immunitarie nel TME possono esercitare un'azione immunosoppressiva/pro-tumorale come i linfociti T regolatori (Tregs) e le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSCs), oppure immunostimolatoria/antitumorale come nel caso dei linfociti T citotossici (CTLs), cellule dendritiche (DCs), neutrofili N1-polarizzati e cellule natural killer (NK) [43]. I macrofagi associati al tumore (TAMs) possono assumere un fenotipo pro-tumorale M2 o antitumorale M1 [43]. Il ruolo delle cellule B nella progressione del tumore sembra essere controverso [43]. Negli ultimi anni, la letteratura in merito al TME dei tumori del cane si è notevolmente ampliata concentrandosi su diverse tipologie tumorali tra cui, il melanoma orale, i carcinomi mammari, il carcinoma squamocellulare, l'adenocarcinoma polmonare, il mastocitoma, il linfoma, il HS, l'osteosarcoma, i gliomi e i meningiomi. Inoltre, per alcune di queste, sono state evidenziate associazioni tra la composizione del TME e diversi indicatori prognostici.

Cellule dendritiche

Le DCs derivano da specifici precursori ematopoietici del midollo osseo, si localizzano a livello di tessuti esposti ad antigeni estranei (pelle, intestino, polmoni) e nei relativi linfonodi tributari e possono essere richiamate nei siti di infezione [44]. In queste sedi, le DCs possono essere attivate mediante il riconoscimento innato di profili molecolari associati ai patogeni (PAMPs) o al danno cellulare (DAMPs) oppure tramite mediatori dell'infiammazione quali IL-1β, TNFα, IL-6 e PGE2 [44]. Le DCs sono specializzate nella captazione, processazione e presentazione di antigeni e perciò vengono definite come cellule presentanti l'antigene (APCs) professioniste [44]. Questa loro funzione è fondamentale per il priming dei linfociti T a cui segue la differenziazione in linfociti T helper o citotossici, l'espansione clonale degli stessi e lo sviluppo di linfociti T memoria [44]. L'interazione tra DCs e linfociti T avviene mediante un repertorio di molecole tra cui si trovano il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I e II (MHCI e II) e le molecole di costimolazione CD70 e CD80/CD86 [45]. Inoltre, le DCs presentano antigeni anche ai linfociti B, contribuendo ulteriormente allo sviluppo della risposta immunitaria adattativa [44]. Nel TME le DCs captano, processano e presentano antigeni associati al tumore (TAAs) in associazione a MHC, esprimono chemochine e molecole di costimolazione e producono molecole solubili necessarie all'attivazione dei linfociti T [46]. Tra le molecole di costimolazione espresse dalle DCs, CD80/CD86 svolgono un ruolo chiave nel priming dei linfociti T interagendo rispettivamente con CD28 e CTLA-4. Il CD40, interagendo con CD40L, determina oltre al priming dei linfociti T, anche l'ulteriore attivazione delle DCs. Il CD70 delle DCs è fondamentale nel supporto del priming dei CTLs CD8+ [46]. Pertanto, la presenza di DCs mature attivate all'interno del tumore consente l'attivazione della risposta immunitaria antitumorale ed il richiamo di cellule effettrici [43]. Infatti, studi sul carcinoma polmonare non a piccole cellule dell'uomo dimostrano come la presenza di DCs mature all'interno di strutture linfoidi terziarie (TLS) sia correlato all'infiltrazione di linfociti T e costituisca un forte fattore prognostico indipendente [44], [47]. Tuttavia, alle DCs è attribuito anche un importante ruolo nel controllo della tolleranza sia verso antigeni self che estranei [44]. Ad esempio, l'espressione costitutiva della β -catenina rappresenta il principale meccanismo attraverso il quale le APCs promuovono la tolleranza nei confronti dei batteri commensali a livello cutaneo ed intestinale [44]. Analogamente, la via di segnalamento della β -catenina si è dimostrata essere alla base dell'esclusione dei linfociti T dal TME [44]. Un ulteriore meccanismo alla base della tolleranza immunologica dipende dall'interazione di diverse molecole espresse dalle DCs con recettori inibitori espressi dai linfociti T quali PD-1 e CTLA-4 [44].

Macrofagi associati al tumore (TAMs)

I macrofagi svolgono un ruolo chiave sia nell'immunità innata che adattativa mediante la loro elevata plasticità funzionale [48]. Essi sono implicati nella genesi dell'infiammazione e della risposta immunitaria e partecipano alla riparazione tissutale [48]. Le principali funzioni immunitarie dei macrofagi includono la fagocitosi, la presentazione antigenica, la secrezione di citochine e di componenti del complemento [48] I TAMs costituiscono una parte significativa del TME e derivano principalmente dai monociti circolanti richiamati all'interno del TME da mediatori quali CCL2, CCL5, CSF-1, GM-CSF e C5a [48]. Tuttavia, sembra che una certa quota di TAMs possa derivare anche da macrofagi tissutali residenti e da MDSCs differenziate in macrofagi maturi [49]. I TAMs subiscono una polarizzazione funzionale influenzata dall'ambiente tissutale in cui si trovano [48]. La polarizzazione macrofagica consiste nella modificazione del metabolismo, dell'espressione genica e di marker di superficie dei macrofagi suscitata dall'effetto di citochine e fattori di crescita [49]. La polarizzazione verso il fenotipo M1 può essere indotta da stimoli quali INFγ, TNFα, LPS ed altri ligandi dei Toll like Receptors (TLR). Al contrario, mediatori quali IL-4, IL-10, IL-13 e TGF-β guidano la polarizzazione verso il fenotipo M2 [49]. I principali marker impiegati nell'uomo per l'identificazione dei macrofagi M1 sono CD80, CD86, MHCII e CD64; mentre i macrofagi M2 si distinguono per l'espressone di CD163, CD204, CD206 e FIZZI [49]. I macrofagi polarizzati M1 hanno una funzione pro-infiammatoria contraddistinta dalla produzione di citochine, tra cui TNFα, INFγ IL-1β, IL-6 e IL-12 [48]. I macrofagi M1 esprimono l'ossido nitrico sintetasi (iNOS) responsabile della produzione di ossido nitrico (NO) e specie reattive dell'ossigeno (ROS) che determinano la citotossicità diretta delle cellule tumorali [48]. Inoltre, i macrofagi M1 uccidono le cellule tumorali mediante meccanismi di citotossicità cellulo-mediata anticorpo dipendente (ADCC) in presenza di anticorpi rivolti verso TAAs [48]. Al contrario i macrofagi polarizzati M2 sono normalmente responsabili della rimozione di detriti cellulari, della riparazione tissutale e della promozione dell'angiogenesi. Tali funzioni assumono un ruolo pro-tumorale all'interno del TME [48]. I TAMs M2 producono citochine antinfiammatorie quali IL-10 e TGF-\beta che contribuiscono allo spegnimento della risposta immunitaria contro le cellule tumorali [43], [48]. I macrofagi M2 sostengono direttamente le cellule tumorali attraverso la produzione di fattori di crescita, tra cui EGF, PDGF, HGF [48]. Inoltre, è stato osservato che il metabolismo dei TAMs supporta la crescita tumorale aumentando la diponibilità di ferro nel TME [49]. È noto che i macrofagi M2 sostengono lo sviluppo tumorale e la formazione di metastasi mediante la promozione dell'angiogenesi ed il rimodellamento della matrice extracellulare nello stroma tumorale [43]. La produzione di metalloproteasi (MMPs),

serine e catepsine da parte dei macrofagi M2 è responsabile della decomposizione della matrice cellulare e delle giunzioni delle cellule endoteliali e stromali favorendo la migrazione e l'intravasazione delle cellule neoplastiche e quindi la formazione di metastasi [48]. La proliferazione di cellule endoteliali e la neoangiogenesi vengono sostenute da diversi mediatori prodotti dai macrofagi M2 tra cui BFGF, VEGF, IL-1, IL-8, TNFα, MMP-9, MMP-2 e COX-2 [48]. I TAMs stabiliscono complesse relazioni con le altre tipologie cellulari presenti all'interno del TME. Ad esempio, è stato osservato che sia i fibroblasti associati al tumore che le cellule mesenchimali stromali supportano polarizzazione verso il fenotipo M2 [49]. I TAMs sono implicati nel mantenimento di un ambiente immunosoppressivo mediante l'inibizione dei linfociti T CD4+ e CD8+ e delle NK [49]. La proliferazione delle cellule T viene inibita dalla deplezione della L-arginina nel TME di cui i TAMs sono responsabili [49]. Inoltre, I TAMs sostengono la differenziazione dei Treg ed il reclutamento degli stessi nel TME [49]. L'impatto prognostico dei TAMs è stato ampiamente studiato sia nell'uomo che nel cane in diverse tipologie tumorali. I TAMs si sono dimostrati un fattore predittivo anche per quanto riguarda la risposta al trattamento e lo sviluppo di resistenza a diversi approcci terapeutici [49]. Tuttavia, dato l'elevato numero di studi, emergono conclusioni contrastanti circa l'impatto prognostico dei TAMs [49]. Tali risultati dovrebbero essere interpretati alla luce del fatto che i marker impiegati per l'identificazione dei TAMs e dei fenotipi M1/M2 possano variare a seconda degli studi [49]. Inoltre, i marker impieganti nel cane sono generalmente scelti sulla base di dati derivanti da studi condotti nell'uomo e nel topo [49]. I principali marker impiegati per l'identificazione dei TAMs nel cane sono Iba-1, MAC387, CD163, CD204, iNOS. Iba-1 (Ionized binding calcium adapter 1) è espresso da macrofagi e cellule della microglia ed in medicina veterinaria viene generalmente impiegato per l'identificazione dei TAMs totali [50]. CD163 e CD204 sono considerati marker tipici del fenotipo M2 [50]. MAC387, conosciuto anche come calprotectina o S100A8/A9 è espresso da neutrofili, monociti, cellule dendritiche e macrofagi attivati e nel cane è stato impiegato per l'identificazione sia dei TAMs totali che dei macrofagi M1 e dei macrofagi reclutati recentemente [49]. L'espressione di iNOS è considerata una prerogativa dei macrofagi M1 ed è stata impiegata per l'identificazione degli stessi nella specie canina [49], [51]. L'elevata infiltrazione di TAMs si è dimostrata essere associata con una minore sopravvivenza complessiva, una maggiore incidenza di metastasi, un grado istologico maggiore, ed una maggiore espressione di VEGF nei tumori mammari del cane [49]. Al contrario, uno studio riporta un'associazione positiva tra il numero di TAMs ed il tempo di sopravvivenza in casi di carcinoma mammario del cane. Tuttavia, considerando solamente i macrofagi M2, è stata riscontrata una maggiore incidenza di metastasi linfonodali [49]. Il numero di TAMs è risultato essere associato ad un grado tumorale maggiore in gliomi, linfomi, mastocitomi e sarcomi dei tessuti molli del cane [49]. Nel melanoma orale del cane l'infiltrazione di macrofagi M2 CD163+ è associata con la conta mitotica, l'atipia nucleare, lo sviluppo di metastasi e la morte dovuta alla malattia neoplastica [49]. Un recente studio ha evidenziato come il numero di macrofagi M2 CD204+ sia associato ad una sopravvivenza complessiva ridotta nel carcinoma a cellule di transizione e nell'adenocarcinoma polmonare del cane [52]. Al contrario, nell'osteosarcoma canino è stato osservato un intervallo di tempo maggiore prima della recidiva in associazione con l'infiltrazione di macrofagi M2 [49].

Linfociti infiltranti il tumore (TILs)

I termine linfociti infiltranti il tumore (TILs) indica linfociti che infiltrano il tumore localizzandosi all'interno dei nidi di cellule neoplastiche o all'esterno di essi ma in stretto contatto con le cellule neoplastiche. I TILs comprendono diverse tipologie cellulari quali principalmente CD4+, CD8+, Treg, ma anche, linfociti T γ/δ cellule B CD20+, PC e cellule NK [53].

I linfociti T CD3+ vengono classificati a seconda delle subunità che compongono il recettore delle cellule T (TCR) e l'espressione dei marker CD4 e CD8.[45] Le cellule TCR $\alpha\beta$ + CD4+ e CD8+ costituiscono la principale tipologia di cellule T identificabili in tessuti sani e neoplastici [45]. Le cellule T CD8+ o linfociti T citotossici (CTLs) sono considerati i principali effettori della risposta immunitaria antitumorale mediante l'uccisione diretta delle cellule neoplastiche [43]. I CTL naïve sono in grado di riconoscere antigeni presentati dalle DCs in associazione al complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHCI) grazie al TCR [54]. Un ulteriore segnale di attivazione per i CTLs è fornito dalle molecole di co-stimolazione CD27 e CD28 che interagiscono con i rispettivi ligandi CD70 e CD80/CD86 sulle DCs [54]. I CTLs attivati acquisiscono la capacità di riconoscere antigeni sulle cellule tumorali in associazione a MHCI [43], [54]. L'uccisione delle cellule tumorali da parte dei CTLs può avvenire mediante l'esocitosi di granuli contenenti granzimi e perforina oppure tramite l'induzione dell'apoptosi per via del recettore FasL. Inoltre, i CTLs attivati producono INF γ e TNF α che inducono la citotossicità nelle cellule tumorali e stimolano l'attivazione dei macrofagi M1 [43], [54]. I CTLs sono associati ad una prognosi più favorevole in quasi tutte le tipologie di cancro [45]. I CTLs non svolgono la loro funzione indipendentemente in quanto l'interazione con i linfociti T helper CD4+ (Th) è necessaria per un'efficace risposta immunitaria antitumorale [45]. I Th CD4+ riconoscono antigeni presentati in associazione al complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHCII) e consentono l'ottimale attivazione dei CTLs tramite la produzione di INFy e IL-2. Inoltre, i Th CD4+ promuovono l'attivazione delle DCs e la relativa espressione delle molecole di costimolazione necessarie all'attivazione dei CTLs [43]. Sembra che l'espressione di CXCL13 da parte dei Th sia coinvolta nella formazione delle strutture linfoidi terziarie (TLSs) intra-tumorali [45]. In più, i Th possiedono meccanismi che consentono la lisi diretta delle cellule neoplastiche [45] Tuttavia, la funzione anti-tumorigenica dei linfociti T all'interno del TME è spesso inibita da diversi meccanismi di evasione immunitaria. Un ulteriore segnale di attivazione per i CTLs è fornito da recettori noti come checkpoint immunitari, i quali possono presentare una funzione stimolatoria oppure inibitoria come nel caso di CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3. È noto che diverse tipologie di tumore sfuggano alla risposta immunitaria inibendo l'attivazione dei CTLs mediante l'espressione di ligandi come PD-L1 che interagiscono con i checkpoint immunitari inibitori [43]. Inoltre, la stimolazione antigenica protratta e l'infiammazione all'interno del TME determinano la disfunzione delle cellule T che entrano in uno stato di esaurimento caratterizzato da una ridotta produzione di citochine e da una carente attività citotossica e proliferativa [43]. I linfociti T esausti sono caratterizzati da un'aumentata espressione di PD-1, LAG-3 e TIM-3 [45] La presenza di linfociti T CD3+ è stata descritta in diverse tipologie tumorali del cane [53], [55]–[59]. Nell'HS del cane l'infiltrazione di CD3+ si è rivelata essere associata ad una tempo di sopravvivenza prolungato [60]. Al contrario, l'infiltrazione di linfociti T CD3+ nel carcinoma mammario assume una valenza prognostica negativa in diversi studi [61]–[63].

I linfociti T regolatori (Treg) svolgono normalmente la funzione di regolazione sopprimendo l'eccessiva attivazione della risposta immunitaria [43]. I Treg sono caratterizzati dall'espressione dei marker CD4, CD25 e forkhead box P3 (Foxp3); quest'ultimo assume un ruolo critico per la regolazione della funzione immuno-soppressoria di queste cellule [43]. Infatti, mutazioni a carico del gene Foxp3 determinano l'insorgenza di malattie autoimmuni sia nel topo che nell'uomo. Pertanto, Foxp3 è considerato il marker più affidabile per l'identificazione dei Treg [64]. I Treg sono noti per la loro azione pro-tumorale dovuta alla produzione di citochine immuno-soppressive quali IL-10, IL-35 e TGFβ che determinano la soppressione dei CTLs e la risposta immunitaria antitumorale [45], [64]. Inoltre, i Treg esprimono costitutivamente il checkpoint immunitario CTLA-4 che interagendo con il CD80/CD86 sulle APCs previene l'attivazione dei linfociti T in modo competitivo [45]. Studi nell'uomo hanno evidenziato come le cellule tumorali ed il TME possano produrre una serie di chemochine responsabili del reclutamento dei Treg. Le chemochine CCL5, CCL20, CCL22 e CCL28 mediano il richiamo di Treg nel TME interagendo rispettivamente con CCR5, CCR6, CCR4, CCR10 [64]. L'infiltrazione di Treg è stata associata ad una prognosi sfavorevole i diverse tipologie tumorali dell'uomo tra cui il melanoma, il carcinoma squamocellulare, il carcinoma epatocellulare, tumori polmonari, mammari e gastrici [64]. Nel cane, l'infiltrazione di Treg è stata osservata nel melanoma orale, nel seminoma, nell'HS, nel linfoma intestinale, nel carcinoma mammario, nel mastocitoma, nell'osteosarcoma e nei gliomi [64]-[69]. Inoltre, è stato dimostrato che la percentuale di Treg circolanti è significativamente aumentata in cani affetti da tumori rispetto a cani sani, con un aumento maggiore osservato in casi di carcinoma [70]. Nei carcinomi mammari del cane è stata osservata un'associazione tra fattori prognostici quali il grado istologico, l'invasione linfatica e la necrosi con l'infiltrazione di Treg [64]. Analogamente, l'infiltrazione di Treg è significativamente maggiore nei gliomi di grado elevato rispetto a quelli di basso grado [67]. In casi di linfoma, carcinoma mammario, melanoma orale, carcinoma squamocellulare orale e adenocarcinoma polmonare del cane, è stata registrato un tempo di sopravvivenza minori in associazione ad un' elevata infiltrazione di Treg [64]. Nell'osteosarcoma del cane, confrontando l'infiltrazione di Treg tra la lesione primaria e le relative metastasi, è stata osservata una maggiore presenza di cellule Foxp3+ a livello delle seconde [69]. Nel HS del cane, un'aumentata espressione dell'mRNA di Foxp3 e TGF β è stata associata ad una prognosi più sfavorevole [65].

Le NK CD3- CD56+ all'interno del TME manifestano un'azione simile a quella dei CTLs uccidendo le cellule tumorali tramite il rilascio di granzimi e perforine e l'induzione dell'apoptosi mediata dal TNF α [43], [45]. Le NK rilasciano citochine e chemochine che sostengono la risposta antitumorale quali l' INF γ che promuove il priming dei Th [45]. Un possibile meccanismo di evasione immunitaria delle cellule tumorali consiste nella diminuzione dell'espressione di MHCI al fine di prevenire l'attività dei CTL. In tale contesto, l'attività delle NK viene favorita dall'assenza dei segnali forniti da MHCI [71]. Inoltre, le NK sostengono la risposta antitumorale anche attraverso il richiamo di DCs [45]. Tuttavia, alcuni studi indicano come la funzione delle NK sia inibita all'interno del TME a causa di un'immaturità che comporta una ridotta espressione di perforine e granzimi [43]. I dati in merito alla presenza di NK nei tumori del cane sono scarsi

Le cellule B esprimono il marker CD20 ad ogni stadio maturativo fatta eccezione per la differenziazione in plasmacellule (PC) in cui tale marker viene perso [72]. La presenza di cellule B è stata associata ad una prognosi più favorevole in diverse tipologie di tumorali dell'uomo [45], [72]. L'azione antitumorale delle cellule B si esplica mediante la loro funzione di APCs che consente il priming dei Th CD4+. Benché le cellule B siano APCs meno efficienti rispetto alle DCs, sembra che esse possano captare antigeni presenti a basse concentrazioni con elevata affinità e diversi studi suggeriscono un loro ruolo importante nell'iniziale attivazione dei Th CD4+ [45]. È stato dimostrato in modelli murini ed umani che le cellule B siano in grado di presentare efficacemente ai Th CD4+ antigeni associati al tumore (TAAs) [45]. Inoltre, Le cellule B sono alla base della risposta immunitaria antitumorale di tipo umorale come dimostrato dall'espansione clonale delle stesse e dallo switch fenotipico anticorpale osservati in diverse tipologie tumorali [45]. La produzione di anticorpi specifici per antigeni tumorali consente l'uccisione delle cellule tumorali tramite un meccanismo di citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) [45]. Le cellule B possono determinare l'uccisione diretta delle cellule tumorali mediante la produzione di INFy e granzima B. Tuttavia, alle cellule B è imputata anche un'azione pro-tumorale dovuta al richiamo di MDSCs ed alla promozione dell'angiogenesi [45]. Un ulteriore meccanismo a favore della progressione tumorale è connesso alle cellule B regolatorie (Breg), le quali rappresentano una sottopopolazione di cellule B con funzione immunosoppressiva [45]. Quest'ultima funzione si realizza mediante la produzione di IL-10, IL-35 e TGF β che determinano l'inibizione della differenziazione di DCs, CTLs e Th e promuovono la differenziazione dei Treg [45]. Le Breg sembrano essere associate ad una prognosi più sfavorevole, ma l'assenza di marker specifici per la loro identificazione limita la comprensione del loro ruolo nel TME.

Le PC CD20-, CD38+, CD138+, CD79a+ rappresentano la principale popolazione cellulare deputata alla produzione di anticorpi e ad esse è imputato un ruolo importante nello sviluppo dell'immunità antitumorale [45]. L'attività antitumorale delle PC si esplicherebbe attraverso la produzione di anticorpi specifici per le cellule tumorali con la conseguente attivazione del sistema del complemento e la promozione dell'ADCC [72]. La presenza di PC è stata associata ad una prognosi più favorevole in diverse tipologie tumorali dell'uomo e alcune analisi suggeriscono che le PC abbiano un significato prognostico più forte rispetto ai linfociti B [72]. Tuttavia, è stato osservato che il deposito intra-tumorale di immunocomplessi possa determinare il reclutamento $Fc\gamma$ -mediato di MDSCs e macrofagi di cui è nota l'azione pro-tumorale [45].

Strutture linfoidi terziarie (TLSs)

Le cellule immunitarie possono localizzarsi in sede intra-tumorale o peritumorale, o più specificatamente a livello di margine invasivo, in prossimità dei vasi sanguigni o nello stroma tumorale [73]. Inoltre, differenti tipologie cellulari mostrano spesso una localizzazione diversa [45]. Le TLSs costituiscono strutture ben organizzate che riproducono l'organizzazione degli organi linfoidi secondari: esse presentano una zona ricca di cellule T in associazione a un follicolo di cellule B in stretto contatto con DCs follicolari e circondato da PCs [45]. In prossimità delle TLSs è possibile osservare venule ad endotelio alto (HEVs), tramite le quali ha luogo la migrazione dei linfociti dal circolo sanguigno [74]. La presenza delle TLSs è riportata in diverse condizioni associate all'attivazione della risposta immunitaria adattativa, tra cui malattie autoimmuni, infezioni, neoplasie e trapianti d'organo [45], [74]. La formazione delle TLSs è promossa dalla produzione della chemochina CXCL13 da parte delle cellule stromali o dai linfociti CD4+ che media il richiamo di cellule immunitarie mediante l'interazione con CXCR5 [45]. La genesi delle TLSs può anche essere iniziata da cellule B, linfociti T helper 17 e macrofagi M1 [45]. La migrazione dei linfociti all'interno delle TLS avviene tramite le HEVs esprimenti MECA-79 [45]. Le TLS possono localizzarsi a livello intra-tumorale, peri-tumorale, nello stroma o a livello del margine invasivo [45], [74]. Lo stadio di maturazione delle TLS varia da densi aggregati linfocitari fino a strutture ben organizzate che riproducono follicoli primari o secondari caratterizzati dalla presenza di DCs e di un centro germinativo [45]. Nelle TLSs hanno luogo diversi meccanismi antitumorali, tra cui l'attivazione e l'espansione clonale di diverse cellule effettrici, la produzione di anticorpi e lo switch fenotipico anticorpale [45]. Infatti, la presenza dei TLSs è risultata essere un fattore prognostico favorevole ed un indicatore di risposta all'immunoterapia in diverse tipologie tumorali dell'uomo [45], [72], [74]. Tuttavia, non solo la presenza, ma anche la composizione e lo stadio maturativo delle TLSs ha un impatto sulla genesi della risposta antitumorale [45], [74]. Ad esempio, nel carcinoma colon-rettale e nel carcinoma squamocellulare dell'uomo, la presenza di TLSs mature dotate di un centro germinativo si è rivelata essere un fattore prognostico positivo, a differenza della presenza di TLS immature [45]. La letteratura in merito alle TLS nelle neoplasie del cane è estremamente scarsa. Giambrone et al. (2022) descrivono nei carcinomi mammari di alto grado la presenza di aggregati linfocitari perivascolari ben organizzati e in associazione a cellule dendritiche CD21+ e HEVs MECA79+ compatibili con la formazione di TLSs [74]. Tale rilievo suggerisce che, analogamente a quanto si osserva nei tumori mammari umani, le TLSs rappresentino un fattore prognostico negativo nei tumori mammari della cagna [74].

Microambiente immunitario dei sarcomi dei tessuti molli

I STS sono tradizionalmente considerati tumori immunologicamente "freddi" sulla scorta della scarsa presenza di cellule immunitarie osservabili in istopatologia [75], [76]. Ciò è probabilmente da imputare allo scarso carico mutazionale tumorale, osservato nei STS dell'uomo, che risulta nell'assenza di neo-antigeni che consentano il riconoscimento da parte delle cellule immunitarie [38]. Nell'uomo, i STS vengono suddivisi secondo il profilo molecolare in due gruppi: la maggioranza dei STS dell'uomo presenta un profilo mutazionale complesso caratterizzato da diverse alterazioni genetiche; un gruppo più ristretto include STS per cui sono note traslocazioni cromosomiche e mutazioni specifiche [7], [38]. Tale classificazione sembra essere correlata con le caratteristiche del TME: i STS associati a specifiche traslocazioni e caratterizzati da un carico mutazionale scarso presentano un'infiltrazione ridotta di cellule immunitarie se comparati a STS con un carico mutazionale maggiore. Ad esempio, il UPS, caratterizzato da un'elevata infiltrazione di CD8+, è noto per il suo carico mutazionale più ricco [38]. La letteratura in merito al TME dei STS dell'uomo è relativamente ristretta e basata principalmente su studi dell'espressione genica da cui emerge che, contrariamente all'ipotesi secondo cui i STS siano tumori immunologicamente inattivi, una quota significativa di tumori sia caratterizzata dall'infiltrazione di varie cellule immunitarie e che la composizione del TME sia variabile tra i diversi istotipi. Tuttavia, sembra che la tipologia cellulare prevalente sia rappresentata dai macrofagi M2 e dei linfociti CD8+ [38]. Diversi autori hanno proposto sistemi di classificazioni dei STS basati sulla composizione del TME. Un lavoro di Deng et al. (2020) basato sull'analisi dei dati trascrittomici di 869 STS di diversi istotipi ha identificato tre classi caratterizzate da un diverso profilo immunitario: il gruppo A è stato caratterizzato per un' elevata infiltrazione di macrofagi M2 in associazione ad una scarsa presenza di CD4+, il gruppo B si è rivelato essere dominato dalla presenza di macrofagi non polarizzati M0 mentre il gruppo C, presentante un elevata infiltrazione di macrofagi M1, dimostrava anche una maggiore presenza di CD8+ e PCs. [38]. Gu et al. hanno identificato due gruppi prognostici basandosi sull'infiltrazione di cellule CD8+ e l'espressione di citochine pro-infiammatorie [38]. Un sistema, indicato come Sarcoma Immune Classification (SIC), è stato proposto da Petitprez et al. (2020) basandosi su dati trascrittomici di un gruppo numeroso di LMS, UPS e liposarcomi sdifferenziati [38]. Il sistema di classificazione ha distinto 5 classi immunitarie (A, B, C, D ed E) caratterizzate da profili ben distinti: la classe A, denominata "immune desert", era caratterizzata dalla minore espressione di geni correlati a cellule immunitarie; contrariamente, la classe E era caratterizzata dall'espressione più elevata di geni correlati alla presenza di linfociti T, CTLs, NK e, in particolare, di linfociti B [75]. La classe E ha presentato un tempo di sopravvivenza complessivo maggiore e, inaspettatamente, il fattore prognostico positivo più incisivo è stata l'espressione di geni correlati alla presenza di cellule B [75]. Il SIC è stato poi validato in situ mediante l'analisi IHC di una coorte indipendente di STS. La densità di CD3+, CD8+, e CD20+ si è dimostrata essere massima nella classe E, minima nella classe A [75]. La classe E ha presentato la maggiore espressione di CXCL13 e la maggiore presenza di TLSs osservabili in IHC. Inoltre, la presenza di TLSs si è rivelata essere in associazione con una maggiore infiltrazione di cellule CD3+ e CD20+, suggerendo che la presenza di queste strutture sia fondamentale per la genesi di una risposta immunitaria antitumorale ed abbia anch'essa una valenza prognostica [75]. Tuttavia, la maggiore espressione di geni codificanti per i checkpoint immunitari PD-1, PDL2, CTLA4 e TIM3 osservata nella classe E, indica il possibile esaurimento delle cellule immunitarie presenti nel TME dei tumori della stessa classe [75]. A conferma di ciò, i tumori della classe E hanno presentato la migliore risposta al trattamento con ICIs [75]. Studi successivi hanno dimostrato il ruolo nelle TLSs come indicatore di risposta all'immunoterapia con ICIs nei STS [38]. I dati derivati dagli studi trascrittomici dei STS dell'uomo sono supportati da analisi in situ mediante IHC. Quest'ultimi testimoniano la presenza di TILs più o meno abbondante nei diversi istotipi. È stato riportato che dal 25% al 43% dei STS presentano un'elevata infiltrazione di CD3+, di cui la maggior parte è rappresentata da CD8+ e solo in parte minore da Foxp3+. Inoltre, la presenza di CD8+ si è rivelata essere correlata positivamente con l'infiltrazione di macrofagi M1 e negativamente correlata con quella dei macrofagi M2. Quest'ultimi si confermano essere il tipo cellulare prevalente nel TME dei STS, e la loro presenza controbilancia il ruolo prognostico positivo legato alla presenza di linfociti B CD20+ [38]. La letteratura in merito al TME dei STS del cane è estremamene limitata e non sono disponili studi che ne caratterizzino dettagliatamente le popolazioni cellulari [76]. Uno studio finalizzato alla comparazione di FSA del cane con origine a livello di siti di iniezione e non e FISS ha evidenziato che i primi si accompagnano ad una risposta infiammatoria costituita dalla formazione di strutture follicolari alla periferia del tumore. Contrariamente, i FSA con origine in altre sedi presentavano raramente infiltrati perivascolari di linfociti [25]. Uno studio su 38 STS del cane ha evidenziato un'abbondante presenza di TAMs Iba1+ occupanti un'area dal 5% al 62%. Inoltre, l'area occupata dai TAMs si è rivelata essere correlata positivamente con l'indice mitotico e il grado del tumore. Tuttavia, quest'ultima ricerca non ha impiegato marker finalizzati alla distinzione tra M1 e M2 [77]. L'espressione di PD-L1 non è stata rilevata in un' analisi di 5 STS del cane [76].

Scopo dello studio

I STS rappresentano dall'8 al 18% delle neoplasie cutanee del cane[1]–[4]. Si stima che ogni anno negli Stati Uniti vengano diagnosticati approssimativamente 95.000 casi di STS nella popolazione canina con una mortalità che va dal 20% al 30% [10]. I STS sono tradizionalmente considerati tumori immunologicamente "freddi" sulla scorta della scarsa presenza di cellule immunitarie osservabili in istopatologia [75], [76]. Concordemente, l'impiego di anticorpi anti-PD-L1 per il trattamento dei STS dell'uomo ha restituito risultati deludenti. Tuttavia, studi del TME dei STS dell'uomo rivelano come i tumori caratterizzati da un'elevata infiltrazione di macrofagi M1, linfociti T CD8+ e linfociti B CD20+ presentino una prognosi migliore rispetto a quelli con un'elevata infiltrazione di macrofagi M0/M2. Inoltre, la presenza di TLSs nei STS è stata associata ad una maggiore infiltrazione intra-tumorale di cellule immunitarie e ad una migliore risposta al trattamento con ICIs [38]. La letteratura in merito al TME dei STS del cane è estremamene limitata e non sono disponili studi che ne caratterizzino dettagliatamente le popolazioni cellulari [76]. Lo scopo del presente studio è quello di caratterizza le popolazioni cellulari immunitarie presenti nel TME di diversi istotipi di STS del cane mediante l'impiego di tecniche IHC. In particolare, lo studio è volto a identificare e quantificare linfociti T CD3+, linfociti Treg Foxp3+, linfociti B CD20+, plasmacellule MUM-1+ e macrofagi M1 MAC387+. Inoltre, verranno studiate le differenze del TME tra i vari istotipi, le correlazioni tra le diverse tipologie cellulari immunitarie e fattori prognostici validati per i STS del cane (grado e indice mitotico). Una caratterizzazione estensiva del microambiente immunitario dei STS del cane potrebbe risultare nell'identificazione di indicatori prognostici o di possibili target terapeutici. Inoltre, lo studio dei STS del cane potrebbe contribuire alla comprensione della controparte umana in un'ottica comparativa.

Materiali e metodi

Selezione dei campioni

È stata eseguita una ricerca retrospettiva nell'archivio informatico dell'U.O. di Anatomia Patologica Veterinaria dell'Università di Parma; si è tenuto conto dei referti istopatologici stesi dall'anno 2007 all'anno 2022. Sono stati selezionati casi soddisfacenti i seguenti criteri di inclusione:

- Campioni tissutali bioptici o escissionali. Sono stati esclusi i campioni citologici.
- Diagnosi istopatologica compatibile con STS e relativi sottotipi (PWT, PNST, FSA, MS, LS, LMS, RMS, UPS; MM e US). Sono stati esclusi i casi di HSA, HS e SS.
- Localizzazione cutanea, sottocutanea e orale. Sono stati esclusi i casi con localizzazione viscerale.
- Disponibilità di campioni tissutali fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) di dimensioni sufficienti per le successive analisi (>0,5 cm).

Trentuno casi sono stati inclusi nello studio. Le informazioni dei relativi cani, tra cui età, sesso, sterilizzazione/castrazione, razza e localizzazione del tumore, sono state raccolte mediante una ricerca nel software gestionale (feniceVET di ZakaSoft s.r.l) dell'Ospedale Veterinario Didattico dell'Università di Parma

Colorazione con ematossilina eosina

Per ogni campione, una sezione dello spessore di 5µm è stata tagliata mediante l'utilizzo di un microtomo. La sezione così ottenuta è stata fatta distendere in acqua distillata fredda e, successivamente, in acqua distillata riscaldata a 45°C. Le sezione sono quindi state raccolte su vetrini portaoggetto e lasciate aderire in stufa per una notte. Le sezioni sono state immerse per 20 minuti in xilene per consentire l'eliminazione della paraffina. Successivamente le sezioni sono state reidratate tramite immersione per cinque minuti ciascuno in una scala decrescente di alcol 100%-100%-95% e acqua distillata. Le sezioni sono quindi state colorate mediante un passaggio di 3 minuti in ematossilina di Mayer ed un passaggio di 1 minuto in eosina. Successivamente, le sezioni sono state lavate in acqua corrente, disidratate mediante passaggi in una scala crescente di alcol alcol e diafanizzate in xilene. Una vetrino coprioggetto è stato montato su ogni sezione mediante liquido di montaggio anidro (CVR Mount di Bio-Optica) e lasciato asciugare.

Caso	Numero registro	Razza	Sesso	Età (mesi)	Localizzazione
1	277/21	Meticcio	М	92	arto
2	126/21 (1)	Meticcio		180	testa
3	22/21 (2)	-	М	96	arto
4	33/22	Meticcio	FS	180	tronco
5	349/20	Labrador retriever	FS	144	tronco
6	45/18	Boxer	F	132	arto
7	114/20	Meticcio	М	147	tronco
8	321/21	Meticcio	М	120	coda
9	69/21	Meticcio	F	144	arto
10	324/21	Meticcio	F	151	arto
11	222/21	Boxer	F	143	
12	488/20	Meticcio	F	171	arto
13	98/15	Golden retriever	MC	144	tronco
14	167/12	Pastore tedesco	FS	144	tronco
15	190/10	Segugio	F	96	arto
16	5/10	Epagneul Breton	F	24	tronco
17	368/16	Pointer	F	144	arto
18	60/10	Meticcio	М	120	tronco
19	173/13	Pointer	F	156	arto
20	235/16	Pastore Maremmano	F	144	arto
21	288/16	Meticcio	F	156	arto
22	43/11	Pastore Maremmano	М	144	tronco
23	321/10	Meticcio	F	156	tronco
24	147/10	Meticcio	F	120	
25	191/20 (4)	Pastore tedesco	М	109	
26	341/07	Siberian Husky	FS	132	arto
27	175/16(1)	Labrador retriever	М	120	arto
28	255/11	Meticcio	F	156	arto
29	23/09	Epagneul Breton	F	19	tronco
30	537/20	-	М	144	cavità orale
31	282/09	Puli	MC	108	tronco

Tabella 2 Casi di STS inclusi nello studio

Revisione e grading

Una sezione colorata con HE è stata esaminata al microscopio ottico per ogni caso. I casi sono stati riclassificati secondo la nomenclatura più recente in PWT, PNST, FSA, MS, LS, MM, UPS, LMS, e RMS mediante il riconoscimento di caratteristiche istologiche peculiari (Tabella 1). I casi in cui non è stato possibile identificare l'istotipo sono stati classificati come US. Successivamente, i casi sono stati classificati secondo il sistema di grading riportato da Trojani et. al.

	1	Sarcomi che riproducono il normale tessuto mesenchimale
		adulto (e.g. PWT, PNST, FSA, LS ben differenziati).
	2	Sarcomi con scarsa somiglianza con il normale tessuto
Differenziazione		mesenchimale adulto, ma per i quali può essere determinato
		l'istotipo (e.g. PWT, PNST, FSA, LS scarsamente differenziati).
	3	Sarcomi indifferenziati/ di tipo non noto
Indice mitotico	1	0-9
(10 campi a 400X)	2	10-19
	3	>19
Necrosi	0	Necrosi assente
	1	<i>≤</i> 50%
	2	>50%
Grado istologico	Ι	≤ 3
	II	4-5
	III	≥ 6

Tabella 3 Schema per il grading dei STS di Trojani et al.

Il grading è stato eseguito seguendo le linee guida precedentemente riportate da Dennis et al. (2011). Per ogni caso, è stata valutata al microscopio ottico una sezione istologica colorata con HE considerando aree ben fissate e non eccessivamente complicate da emorragia o infiammazione. La differenziazione è stata valutata tramite osservazione a piccolo ingrandimento e individuazione dei pattern istologici caratteristici (Tabella 1). L'indice mitotico è stato valutato contando il numero di mitosi in 10 campi contigui a 400X nell'area con la maggiore attività mitotica della sezione ed evitando aree con scarsa densità cellulare, complicate da ulcerazione, necrosi o emorragia, La necrosi è stata valutata tenendo conto solamente della necrosi intra-tumorale ed evitando aree di ulcerazione superficiale e traumi legati alla rimozione chirurgica/bioptica.

Immunoistochimica

Per ogni campione, un numero adeguato di sezioni dello spessore di 5µm è stata tagliato mediante l'utilizzo di un microtomo. La sezioni così ottenute sono state fatte distendere in acqua distillata fredda e, successivamente, in acqua distillata riscaldata a 45°C. Le sezioni sono quindi state raccolte su vetrini polilisinati e lasciate aderire in stufa per una notte. I vetrini sono stati immersi per 20 minuti in xilene per consentire l'eliminazione della paraffina. Successivamente i vetrini sono stati reidratati tramite immersione per cinque minuti ciascuno in una scala decrescente di alcol 100%-100%-95%-70% e acqua distillata. Nel presente studio è stato impiegato lo smascheramento antigenico indotto da calore (HIAR) mediante cicli in microonde ed immersione in un buffer di sodio citrato a pH controllato. A seconda dell'antigene ricercato (Tabella 4), i vetrini sono stati inseriti in una soluzione di sodio citrato a pH 6 o pH 8 (2.94 g di sodio citrato tribasico diidrato, 1 L di Acqua Distillata e 500 microL di Tween-20). I vetrini, immersi nella soluzione di sodio citrato, sono stati sottoposti a tre cicli in micro-onde a 400W da 5 minuti ciascuno. Al completamento dei tre cicli i campioni sono stati fatti raffreddare in un bagno con ghiaccio per 20 minuti. Dopo aver raffreddato i vetrini sono stati effettuati tre lavaggi da cinque minuti ciascuno in PBS 1X (Diluizione 1:5 di KCl 0.5g, KH₂PO₄ 0.5g, NaCl 20g Na₂HPO₄ 5,75g e 500ml di Acqua Distillata). Al fine di inibire le perossidasi endogene i campioni sono stati immersi in una soluzione di perossido di idrogeno al 6% in PBS per circa 15 minuti. In seguito, sono stati effettuati tre lavaggi di 5 minuti ciascuno in PBS 1X. Per l'antigen blocking, sono stati impiegati il Normal Goat Serum (NGS) o il Normal Rabbit Serum (NRS) a seconda dell'anticorpo secondario utilizzato (Tabella 4). Il siero di interesse è stato diluito 1:5 con albumina sierica bovina all'1% (BSA) e un'aliquota di 250µl è stata trasferita su ogni vetrino. I vetrini sono stati posti in una camera umida per prevenire la disidratazione delle sezioni di tessuto durante l'incubazione. I vetrini sono stati lasciati in incubazione con il siero aspecifico per 20 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, il siero precedentemente depositato sul vetrino è stato rimosso. In seguito, i vetrini sono stati nuovamente posizionati nella camera umida e sono stati aggiunti su ogni vetrino 250µl di anticorpo primario diluito secondo il relativo protocollo (Tabella 4). Il controllo positivo è stato allestito con una sezione di linfonodo reattivo di cane, il controllo negativo omettendo l'applicazione dell'anticorpo primario. L'incubazione è stata eseguita ad una temperatura di 4°C. Successivamente, i vetrini sono stati lasciati a temperatura ambiente per circa 20 minuti seguiti da tre lavaggi di 5 minuti ognuno in PBS 1X per assicurare l'eliminazione di anticorpo primario in eccesso. In seguito, è stata eseguita l'incubazione con l'anticorpo secondario biotinilato diluito 1:200 (Tabella 4). È stata distribuita un'aliquota di 250µl su ogni vetrino. È seguita un'incubazione di 30 minuti al termine della quale sono stati effettuati 3 lavaggi in PBS 1X da 5 minuti ciascuno. Per poter localizzare l'immunocomplesso antigene-anticorpo è stato impiegato il sistema ABC (complesso avidina biotina). Sono stati depositati su ogni vetrino 250µl di soluzione VECTASTAIN Elite ABC-HRP (Vector Laboratories) preparata secondo le indicazioni del produttore. È seguita un'incubazione nella camera umida di 20 minuti a temperatura ambiente. A fine incubazione sono stati eseguiti 3 lavaggi in PBS 1X da 5 minuti ciascuno. Per poter rendere visibile al microscopio ottico il legame antigene-anticorpo è stato impiegato come substrato della perossidasi il cromogeno DAB (3,3-diaminodenzidina tetraidrocloruro): l'enzima catalizza l'ossidazione del substrato determinando la formazione di un prodotto finale di colore rosso. Sono stati distribuiti su ogni vetrino 250µl di soluzione Vector NovaRED (Vector Laboratories) preparata secondo le indicazioni del produttore. Lo sviluppo colorimetrico ottimale è stato determinato dallo sperimentatore: una volta sviluppatasi una colorazione rosa-rossa sui vetrini, questi sono stati immersi in PBS 1X per 5 minuti e successivamente lavati in acqua corrente. Successivamente, è effettuata la contro-colorazione mediante ematossilina di Mayer, I campioni sono stati immersi in una vaschetta contenente il colorante per 1 minuto e poi sciacquati abbondantemente in acqua corrente. I vetrini sono quindi stati montati con dei vetrini copri-oggetto utilizzando un montante acquoso (Aqueous Mount di Zytomed systems). Su ogni vetrino è stata posta una goccia di montante per poi lasciare aderire il vetrino copri-oggetto applicando una leggera pressione per evitare la formazione di bolle. Successivamente il montante è stato lasciato asciugare.

Antigene Target	Tipo cellulare	Espressione	Smascheramento antigenico	Blocking serum	Ab primario (clone/produttore)	Diluizione Ab primario	Ab secondario biotinilato (clone/produttore)
CD3	Linfociti T	Membrana	HIAR (pH 6)	NGS	Rabbit polyclonal anti-human CD3 (A0452/Dako)	1:80	Goat anti-rabbit IgG (BA-1000-Vector Labs)
CD20	Linfociti B	Membrana	HIAR (pH 6)	NGS	Rabbit polyclonal anti-human CD20 IgG (PA5-16701/Thermo Fisher)	1:400	Goat anti-rabbit IgG (BA-1000- Vector Labs)
MUM-1	Plasmacellule	Nucleare, citoplasmatica	HIAR (pH 8)	NGS	Rabbit monoclonal anti- human MUM-1 IgG (BC5/Biocare)	1:100	Goat anti-rabbit IgG (BA-1000- Vector Labs)
FOXP3	Linfociti T regolatori	Nucleare	HIAR (pH 8)	NRS	Rat monoclonal anti Foxp3 IgG (FJK-16s/Affymetrix)	1:200	Rabbit anti-rat IgG (BA-4001-Vector Labs)
MAC387	Macrofagi M1	Citoplasmatica	HIAR (pH 6)	NGS	Mouse anti-human macrophages IgG (MAC387/Bio-Rad)	1:100	Goat anti-mouse IgG (BA-9200- Vector Labs)

 Tabella 4
 protocolli di IHC impiegati nello studio

Quantificazione delle immuno-positività

Tutti i campioni sono stati valutati mediante osservazione al microscopio ottico (Nikon Eclipse E800). Le diverse tipologie di cellule immunitarie sono state quantificate manualmente in 10 campi HPF scelti casualmente nell'area intra-tumorale. Le aree peri-tumorali, i margini, le aree necrotiche, emorragiche o eccessivamente complicate da infiammazione sono state escluse dal conteggio. Raggruppamenti densi di linfociti riproducenti TLSs sono state evitate nel conteggio. Il conteggio dei linfociti T CD3+ è stato eseguito tenendo conto delle cellule con positività di membrana e morfologia linfocitaria distinta. Il conteggio dei linfocitaria distinta. Il conteggio dei linfocitaria distinta. Il conteggio dei Treg Foxp3+ è stato eseguito tenendo conto delle cellule con positività nucleare e morfologia linfocitaria distinta. Le cellule MUM-1 positive sono state conteggiate in caso di positività nucleare e citoplasmatica e chiare morfologia plasmocitoide. Per il conteggio dei macrofagi M1 MAC397+ sono state conteggiate le cellule con immunopositività citoplasmatica e morfologia istiocitoide; cellule morfologicamente compatibili con neutrofili e monociti non sono stati inclusi nel conteggio.

Dati e analisi statistica

I dati sono stati raccolti e analizzati utilizzando Microsoft Excel e IBM SPSS. I dati raccolti comprendono razza, sesso, età (mesi), localizzazione, diagnosi dopo la revisione istopatologica, grado (1/2/3), score differenziazione (1/2/3), score necrosi (0/1/2), score mitosi (1/2/3) e indice mitotico. La presenza di cellule immunitarie positive in IHC è stata registrata come numero medio di cellule/HPF. Le variabili categoriche sono state descritte mediante frequenze e percentuali. Le variabili continue sono state descritte media \pm errore standard della media e deviazione standard (σ). Per verificare se le variabili continue fossero distribuite normalmente è stato impiegato il test di Shapiro-Wilk. Poiché le variabili hanno mostrato una distribuzione non normale le successive analisi hanno impiegato test non parametrici. Il test di Kruskal-Wallis e il confronto a coppie sono stati impiegati per comparare la densità di cellule immunitarie tra tumori di diverso istotipo (PWT, PSNT, LS, FSA, MS e US), grado (1/2/3), differenziazione e necrosi. Il livello di significatività del confronto a coppie è stato aggiustato mediante la correzione di Bonferroni. La correlazione tra la densità delle diverse cellule immunitarie e l'indice mitotico è stata studiata mediante la correlazione per ranghi di Spearman (una coda). I risultati sono stati considerati statisticamente significativi quando $\rho < 0,05$.

Risultati

Revisione e grading

Nel presente studio sono stati inclusi 31 casi di STS (tabella 2). Sono stati impiegati campioni chirurgici FFPE ad eccezione di un caso per il quale è stato impiegato un campione bioptico. Il 41,9% (13/31) dei casi è stato rappresentato da meticci, seguiti da Boxer (2/31, 6,5%), Epagneul Breton (2/31; 6,5%), Labrador Retriever (2/31, 6,5%), Pastore Maremmano (2/31, 6,5%), Pastore Tedesco (2/31, 6,5%), Pointer (2/31, 6,5%), Golden Retriever (1/31, 3,2%), Puli (1/31, 3,2%), Siberian Husky (1/31, 3,2%). In 3 casi non è stato possibile definire la razza. Il 61,2% (19/31) dei casi era rappresentato da cani di sesso femminile, di cui 4 femmine sterilizzate. I maschi hanno rappresentato il 35,4% (11/31) dei casi e 2 di questi erano castrati. Solo in un caso non è stato possibile determinare il sesso. L'età dei cani inclusi è compresa tra i 19 e 180 mesi con una media di 130 mesi (σ = 37). La maggior parte dei STS era localizzato a livello degli arti (14/31, 45,1%) ed a livello del tronco (11/31, 35,4%). Un solo caso presentava localizzazione a livello della coda, 1 a livello della testa ed 1 a livello della cavità orale (palato duro). In 3 casi non è stato possibile identificare la localizzazione della neoplasia. La maggior parte dei casi inclusi nello studio (15/31, 48,3%) è stata riclassificata come PWT, seguiti da PNST (4/31, 12,9%), LS (4/31, 12,9%), FSA (4/31, 12,9%), US (3/31, 9,7%) e MS (1/31, 3,2%). La localizzazione dei PWT è stata nella maggioranza dei casi a livello degli arti (9/13, 69,2%); la restante parte dei PWT per cui è stato possibile definire la localizzazione si trovavano a livello del tronco (4/13, 30,7%). Due PNST erano localizzati a livello degli arti (2/3, 66,7%) ed 1 a livello del tronco. I LS sono stati ritrovati più frequentemente a livello del tronco (3/4, 75%) e solo in 1 caso a livello degli arti. I FSA sono stati localizzati a livello del tronco (2/4; 50%), degli arti (1/4; 25%) e della testa (1/4, 25%). I 3 US inclusi nello studio erano rispettivamente localizzati a livello di arti, tronco e coda.

Localizzazione	PWT	PNST	LS	FSA	MS	US	Tot.
Arto	9	2	1	1	0	1	14
Tronco	4	1	3	2	0	1	11
Cavità orale	0	0	0	0	1	0	1
Coda	0	0	0	0	0	1	1
Testa	0	0	0	1	0	0	1
Non specificata	2	1	0	0	0	0	3
Tot.	15	4	4	4	1	3	31

Tabella 5: localizzazione e grado dei STS.

I casi sono stati classificati seguendo le linee guida per il grading riportate da Dennis et al. (2011). La maggioranza dei STS inclusi nello studio presentava un basso grado istologico (Grado 1, 16/31, 51,6%). I STS di grado intermedio hanno rappresentato il 32,2% del totale dei casi (Grado 2, 10/31, 32,2%) mentre quelli di alto grado il 16,1% (Grado 3, 5/31, 16,1%). Considerando i diversi istotipi, i PWT hanno presentato un grado istologico basso nella maggior parte dei casi (10/15, 66,7%) oppure un grado intermedio (5/15, 33,3%). I PNST hanno presentato un grado basso nella maggior parte dei casi (3/4, 75%) oppure un grado intermedio (1/4, 25%). I LS inclusi nello studio erano di grado basso (2/4, 50%), grado intermedio (1/4, 25%). I US inclusi sono tutti stati classificati come di grado alto.

Grado	PWT	PNST	LS	FSA	MS	US	Tot.
1	10	3	2	0	1	0	16
2	5	1	1	3	0	0	10
3	0	0	1	1	0	3	5
Tot.	15	4	4	4	1	3	31

Tabella 6 grado e tipologia sei STS inclusi nello studio

Aree necrotiche intra tumorali sono state identificate in 9/31 (29%) STS di cui 3 PWT, 3 US, 2 FSA e 1 LS. La percentuale di necrosi è stata inferiore al 50% in 7/31 (23%) e superiore al 50% in 2/31 (6,5%) casi entrambi rappresentati da US. L'indice mitotico dei STS inclusi nello studio variava da 0 a 61 mitosi per 10 HPF, calcolati rispettivamente in un PWT, un PNST ed in un FSA. L'indice mitotico medio dell'intero gruppo dei STS è stato di 14,06 ± 2,97 mitosi/10 HPF ($\sigma = 16,54$); 4,25 ± 2,66 mitosi/10 HPF ($\sigma = 5,3$) per il gruppo dei PNST, 6,87 ± 1,95/10HPF ($\sigma = 7,57$) per il gruppo dei PWT, 12 ± 5,73 mitosi/10HPF ($\sigma = 20,25$) nei LS, 25,67 ± 3,18 mitosi/10HPF ($\sigma = 5,5$) nei US e 45,75 ± 10,12 mitosi/10HPF ($\sigma = 20,25$) nei FSA. Il test di Kruskal-Wallis ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra gli istotipi per quanto riguarda l'indice mitotico ($\rho = 0,01$). Il confronto a coppie ha evidenziato che il gruppo dei FSA ha presentato un indice mitotico maggiore rispetto al gruppo dei PNST ($\rho = 0,049$) e il gruppo dei PWT ($\rho = 0,035$).

Immunoistochimica

Macrofagi M1 MAC387+

Sono stati sottoposti ad analisi IHC con l'anticorpo primario MAC387 29/31 campioni. Le cellule con immuno-positività citoplasmatica erano morfologicamente assimilabili a macrofagi, neutrofili e monociti sia nei casi oggetto di studio che nel controllo positivo. Le cellule macrofagiche hanno presentato distinta morfologia istiocitoide, spesso con prolungamenti cellulari addossati alle cellule neoplastiche. Nei casi in cui ne è stata identificata la presenza, i macrofagi M1 si sono presentati disseminati all'interno del parenchima tumorale con una densità più o meno elevata e raramente in piccoli gruppi. Le aree caratterizzate da ulcerazione o necrosi hanno presentato un elevato numero di cellule positive rappresentate principalmente da neutrofili e sono state escluse dalla quantificazione.



Figura 6: US con un elevato numero MAC387+ in prossimità di un'area di necrosi (ingrandimento 10x).

Tredici casi (13/29, 44,82%) hanno evidenziato la presenza di macrofagi M1 intra-tumorali. L'infiltrazione di macrofagi M1 è stata rilevata in 9/15 (60%) PWT, in 1/4 LS, in 1/4 FSA, in 1/3 US e nell'unico MS incluso nello studio. In nessuno dei PNST inclusi sono stati ritrovati macrofagi M1. La maggiore infiltrazione di macrofagi M1 è stata evidenziata in un PWT di basso grado con una densità media di 85,5 cellule/HPF. La densità media di macrofagi MAC387+ per l'intero gruppo dei STS è stata di 5,04 ± 3,1 cellule/HPF ($\sigma = 17,12$). La densità media è stata maggiore nei STS di grado basso (8,3 ± 5,69 cellule HPF, $\sigma = 22,76$) e intermedio (7,41 ± 6,27 cellule HPF, σ = 2,27) rispetto a quelli di grado alto (1,33 ± 1,33 cellule/HPF, σ = 2,3). La maggiore densità media è stata rilevata nel gruppo dei PWT (8,66 ± 6,06 cellule/HPF, σ = 7,58), seguiti dai FSA (2,43 ± 2,43 cellule/HPF, σ = 4,21), dai US (2 ± 2 cellule/HPF, σ = 2,83). Il test di Kruskal-Wallis non ha identificato alcuna differenza significativa nella densità di MAC387+ tra gradi e istotipi.



Figura 7: FSA di grado intermedio con moderata infiltrazione di M1 MAC387+ (ingrandimento 20x).



Figura 8: *PWT di basso grado. Si nota l'elevata infiltrazione di M1 MAC387+ con morfologia istiocitoide con prolungamenti cellulari che si addossano alle cellule neoplastiche (ingrandimento 20x).*

Linfociti B CD20+

La totalità dei campioni inclusi nello studio è stata sottoposta ad analisi IHC per l'identificazione dei linfociti B CD20+. Le cellule immuno-positive a livello di membrana presentavano morfologia linfocitaria (sovrapponibile alle positività del controllo positivo). Nel linfonodo di cane impiegato come controllo positivo la maggiore densità di cellule positive è stata individuata a livello della corticale e dei centri germinativi confermando la corretta identificazione dei linfociti B. Nei STS oggetto di studio la maggiore densità di CD20+ intra-tumorali è stata osservata intorno a piccoli vasi sanguigni a formare aggregati in associazione ad altre cellule linfocitarie. Le dimensioni di tali aggregati variavano da piccoli gruppi di poche cellule fino a grandi e densi aggregati riproducenti la struttura degli organi linfoidi secondari e interpretate come TLSs. Inoltre, i linfociti B CD20+ sono stati ritrovati disseminati all'interno del parenchima tumorale con una densità più o meno elevata. La presenza di linfociti B CD20+ è stata osservata anche in prossimità dei margini tumorali, sottoforma di aggregati di dimensioni variabili, e in aree di ulcerazione superficiale in associazione con altre cellule infiammatorie.



Figura 9: *PWT di basso grado. Si notano aggregati intra-tumorali e peri-tumorali contenenti numerosi linfociti B* CD20+ (ingrandimento 4x).

L'infiltrazione di CD20+ è stata osservata in 16/31 casi (51%) di cui 8/15 PWT, 3/4 PNST, 3/4 FSA, 1/3 US e nell'unico MS incluso nello studio. In nessuno dei LS inclusi nello studio è stata osservata la presenza di linfociti B. L'infiltrazione più pronunciata di CD20+ è stata osservata in un FSA di grado intermedio presentante una densità di 63,7 cellule/HPF. La densità media di

cellule CD20+ di tutto il gruppo dei STS è stata di 5,68 ± 2,6 cellule/HPF (σ = 14,49). La densità media è stata maggiore nel gruppo dei STS di grado intermedio (7,41 ± 6,28 cellule/HPF, σ = 19,85) e basso (6,15 ± 3,2 cellule/HPF, σ = 13,14) rispetto a quelli di grado elevato (0,72 ± 0,45 cellule/HPF, σ = 1). La maggiore densità media di CD20+ è stata osservata nei FSA (17,45 ± 15,44, σ = 30,88) seguiti dai PWT (6,76 ± 3,4 cellule/HPF, σ = 13,43), dai US (0,5 ± 0,5 cellule HPF, σ = 0,87) e dai PNST (0,18 ± 0,08 cellule/HPF, σ = 0,15). Il test di Kruskal-Wallis non ha identificato alcuna differenza significativa nella densità di CD20+ tra gradi e istotipi.



Figura 10: FSA di grado intermedio con piccoli aggregati perivascolari costituiti da linfocitici B CD20+ misti ad altre cellule linfocitarie (ingrandimento 20x).

Plasmacellule MUM-1+

La totalità dei campioni inclusi nello studio è stata sottoposta ad analisi IHC per l'identificazione delle plasmacellule mediante l'anticorpo anti MUM-1. L'IHC ha correttamente evidenziato cellule con positività citoplasmatica e nucleare e caratterizzate da morfologia plasmocitoide nel controllo positivo e nei campioni oggetto di studio. La maggiore densità di cellule MUM-1+ è stata osservata all'interno di grandi aggregati linfocitari riproducenti TLSs. Plasmacellule MUM-1+ sono state identificate anche sparse all'interno del parenchima tumorale ed a livello dei margini in associazione ad altre cellule linfocitarie a formare piccoli aggregati. L'infiltrazione intra-tumorale di cellule MUM-1+ è stata evidenziata solo in 3/31 (9,6%). La maggiore presenza di plasmacellule MUM-1+ è stata identificata in un FSA di grado intermedio con una densità di 14,9 cellule/HPF, seguito da un PWT di basso grado con densità di 12 cellule/HPF e da un US di alto grado con densità di 0,8 cellule/HPF. Il test di Kruskal- Wallis non ha identificato alcuna differenza significativa nella densità di MUM-1+ tra gradi o istotipi.



Figura 11: plasmacellule MUM-1+ all'interno di un grande aggregato riproducente una TLS. Si nota la morfologia cellulare plasmocitoide delle cellule immuno-positive (ingrandimento 20x).

Linfociti T CD3+

Dieci dei campioni inclusi nello studio sono stati sottoposti ad analisi IHC per l'identificazione dei linfociti T CD3+. L'IHC ha correttamente individuato cellule con morfologia linfocitaria caratterizzate da positività a livello di membrana nel controllo positivo e nei casi oggetto di studio. Nel linfonodo di cane impiegato come controllo positivo la maggiore densità di cellule positive è stata individuata a livello della para-corticale confermando la corretta identificazione dei linfociti T. Nei STS oggetto di studio la maggiore densità di CD3+ intra-tumorali è stata osservata intorno a piccoli vasi sanguigni a formare aggregati in associazione ad altre cellule linfocitarie. Le dimensioni di tali aggregati variavano da piccoli gruppi fino a grandi e densi aggregati riproducenti la struttura degli organi linfoidi secondari e interpretate come TLSs. Inoltre, i linfociti T CD3+ sono stati ritrovati disseminati all'interno del parenchima tumorale con una densità più o meno elevata. La presenza di linfociti T CD3+ è stata osservata anche in prossimità dei margini tumorali, sottoforma di aggregati di dimensioni variabili. L'infiltrazione intra-tumorale di CD3+ è stata osservata in 7/10 dei casi di cui 6/7 PWT e 1/7 FSA. La densità media di CD3+ nei casi studiati è stata di 52 \pm 41,2 cellule/HPF (σ = 130,30). La maggiore presenza è stata osservata in un PWT di basso grado con una densità di 415 cellule/HPF. Il test di Kruskal-Wallis non ha identificato nessuna differenza significativa tra diversi istotipi e gradi.



Figura 12: *FSA di grado intermedio. Si nota un infiltrato in cui emergono numerosi linfociti T CD3+ raggruppati in sede perivascolare e sparsi all'interno del tessuto neoplastico (ingrandimento 20x.*

Linfociti T regolatori Foxp3+

Tutti i campioni inclusi nello studio sono stati sottoposti ad analisi IHC per l'identificazione di Treg mediante l'anticorpo anti Foxp3. L'IHC ha evidenziato cellule con positività nucleare e caratterizzate da distinta morfologia linfocitaria sia nel controllo positivo che nei casi oggetto di studio. Nei STS, i Treg Foxp3+ sono stati identificati principalmente nelle aree caratterizzate dalla maggiore infiltrazione linfocitaria, ma rappresentando una piccola quota della totalità dei linfociti. I Treg Foxp3+ sono stati osservati principalmente all'interno di aggregati linfocitari perivascolari e di densi aggregati compatibili con TLSs. La presenza di Treg Foxp3+ è stata osservata in 7/31 casi (22,6%) di cui 4/15 PWT (26,7%), 1/4 FSA, 1/3 US e nell'unico MS incluso nello studio. La presenza di Treg non è stata osservata all'interno di LS e PNST. Un caso di PWT di basso grado (caso 222/21) ha mostrato un'infiltrazione di Treg diffusa all'interno del parenchima tumorale e la maggiore densità di Treg intra-tumorali pari a 9,6 cellule/HPF. La densità media di Foxp3+ per tutto il gruppo dei STS è stata di 0.56 ± 0.32 cellule/HPF ($\sigma = 1.81$). La densità media di Foxp3+ è risultata essere leggermente maggiore nei tumori di basso grado (0.95 ± 0.61 cellule/HPF, $\sigma = 2,4$) rispetto ai tumori di grado intermedio (0,14 ± 0,14 cellule/HPF, $\sigma = 0,44$) e alto (0,16 ± 0,16 cellule/HPF, $\sigma = 0.35$). La maggiore densità media è stata individuata nei PWT (0.97 ± 0.65) cellule/HPF, $\sigma = 2,55$). Il test di Kruskal- Wallis non ha identificato alcuna differenza significativa nella densità di Foxp3+ tra gradi e istotipi.



Figura 13: *PWT di basso grado con diffusa infiltrazione di Treg Foxp3+. Si osserva la positività nucleare all'anticorpo anti-Foxp3 (ingrandimento 20X).*

Correlazione tra cellule immunitarie

La correlazione per ranghi di Spearman (una coda) è stata impiegata per studiare l'associazione tra le cellule MAC387+, CD20+, MUM-1+, CD3+ e Foxp3+. La forza della correlazione è stata valutata come debole (0,00-0,39), moderata (0,40-0,79) o forte (0,80-1).

	MAC387	CD3	Foxp3	CD20	MUM-1
MAC387	1,000				
CD3	0,391	1,000			
Foxp3	0,631**	0,831**	1,000		
CD20	0,418*	0,695*	0,521**	1,000	
MUM-1	0,462**	0,692*	0,627**	0,278	1,000

Tabella 7: indici di correlazione di Spearman (* $\rho < 0.05$; ** $\rho < 0.01$).

Sono state osservate delle moderate correlazioni positive tra densità di TAMs MAC387+ e le diverse tipologie di TILs ad eccezione dei CD3+. Quest'ultimo dato deve essere considerato alla luce del fatto che solamente 10 campioni sono stati sottoposti ad IHC per la ricerca dei CD3+. Sono state osservate correlazioni positive moderati-forti tra le diverse tipologie di TILs: la densità di CD3+ ha mostrato una moderata correlazione positiva con CD20 e MUM-1 e una forte correlazione positiva con il numero di Foxp3+.

Correlazione tra cellule immunitarie e indicatori prognostici

Il test di Kruskal-Wallis non ha individuato alcuna differenza statisticamente significativa tra i diversi gradi e istotipi di STS. Nessuna differenza significativa è stata osservata tra i diversi score che compongono il grading dei STS (Score differenziazione, score necrosi e score mitosi). La correlazioni per ranghi di Spearman non ha individuato una correlazione statisticamente significativa tra la densità delle diverse tipologie di cellule immunitarie e l'indice mitotico. Le diverse localizzazioni dei STS non hanno mostrato differenze statisticamente significative nella densità di cellule immunitarie.

No	Numero registro	Revisione	MAC387 /HPF	CD20 /HPF	MUM-1 /HPF	FOXP3/ HPF	CD3 /HPF
1	277/21	FSA	0	4	0	0	-
2	126/21 (1)	FSA	-	2,1	0	0	-
3	22/21 (2)	PNST	0	0,3	0	0	_
4	33/22	PNST	0	0	0	0	-
5	349/20	PWT	0	3,8	0	0	2
6	45/18	PWT	0,1	2,1	0	0	-
7	114/20	PWT	0	4,3	0	0	1
8	321/10	US	0	0	0	0	-
9	69/21	PWT	0,3	8,8	0	1,2	7,4
10	324/21	PWT	85,5	39	12	3,4	415
11	222/21	PWT	1,5	1,2	0	9,6	8,6
12	488/20	US	-	0	0,3	0,8	-
13	98/15	LS	0	0	0	0	-
14	167/12	LS	4,7	0	0	0	0
15	190/10	LS	0	0	0	0	-
16	5/10	LS	0	0	0	0	-
17	368/16	PNST	0	0,1	0	0	0
18	60/10	PWT	1,1	0	0	0	-
19	173/13	PWT	0	0	0	0	-
20	235/16	PWT	0	0	0	0	-
21	288/16	PWT	0	0	0	0	-
22	43/11	PWT	0,9	0	0	0	-
23	321/21	US	4	1,5	0	0	-
24	147/10	PWT	39,3	39	0	0,3	0,5
25	191/20 (4)	PNST	0	0,3	0	0	-
26	341/07	PWT	0,3	2,6	0	0	-
27	175/16 (1)	PWT	0	0	0	0	-
28	255/11	PWT	0,9	0	0	0	0
29	23/09	FSA	0	0	0	0	-
30	537/20	MS	0,4	2,7	0	0,8	-
31	282/09	FSA	7,3	64	14,9	1,4	88,1

Fabella 8 : densità delle cellule MAC387+	, <i>CD20+</i> , <i>Foxp3+ e CD3+</i>	nei casi oggetto di studio.
--	---------------------------------------	-----------------------------



Figura 14: *TLS situata ai margini di un PWT di basso grado. Si nota la presenza di un'area densamente popolata da linfociti B CD20+ circondata da numerosi linfociti T CD3+ ed alcune PCs MUM-1+ (ingrandimento 10x).*

Discussione

I STS rappresentano un gruppo eterogeneo di neoplasie di origine mesenchimale e costituiscono una tra le tipologie più comuni di neoplasie cutanee e sottocutanee del cane. I STS sono tradizionalmente considerati tumori immunologicamente "freddi" [75], [76]. Tuttavia, studi dei STS dell'uomo suggeriscono che alcuni tumori accompagnati da una maggiore infiltrazione di cellule immunitarie presentano una prognosi più favorevole e che istotipi differenti mostrano una diversa composizione del TME [38], [75]. Il presente studio costituisce il primo tentativo di caratterizzazione estensiva del TME dei STS del cane.

Sono stati retrospettivamente selezionati 31 STS con origine a livello cutaneo e sottocutaneo e orale al fine di caratterizzarne il TME mediante IHC per i marker CD3, CD20, MUM-1, Foxp3, MAC387. Le caratteristiche generali della popolazione oggetto di studio sono state compatibili con la normale presentazione dei STS del cane. I cani di sesso femminile (19/31) sono stati di poco maggiormente rappresentati, ma la letteratura non riporta alcuna predisposizione di sesso per i STS [7]. I STS interessano principalmente cani anziani con un'età media di insorgenza compresa tra i 10 e gli 11 anni [7]. Concordemente, l'età media della popolazione oggetto del presente studio è stata di 130 mesi. Solo due casi hanno interessato cani di giovane età presentanti un LS di alto grado ed un FSA di grado intermedio. Anche per quanto riguarda la localizzazione, i casi inclusi hanno riprodotto il normale comportamento dei STS presentandosi soprattutto a livello degli arti (14/31, 45,1%) e del tronco (11/31, 35,4%). I STS del cane vengono tradizionalmente considerati come un gruppo ai fini prognostici [7]. Tuttavia, sia per i STS del cane che dell'uomo, vi sono prove che sostengono l'esistenza di differenze nel comportamento tra gli istotipi [2], A seguito della revisione istopatologica, l'istotipo maggiormente rappresentato nello studio è stato il PWT (15/31), al quale la letteratura attribuisce un comportamento biologico meno aggressivo e recidive più rare rispetto agli altri istotipi raggruppati nei STS [2]. Altri sottotipi meno rappresentati sono stati il PNST (4/31), LS (4/31), FSA (4/31), US (3/31) e MS (1/31). Tuttavia, la tipizzazione dei STS è complicata dalla contemporanea presenza di più pattern istologici e dalla condivisione di alcuni pattern tra più entità patologiche [1], [8]. Pertanto, il mancato impiego di marker IHC che supportino la revisione istopatologica dei casi inclusi costituisce un potenziale limite del presente studio. Il grado istologico è il parametro maggiormente impiegato per la definizione della prognosi dei STS [34], [35]. I STS di basso grado sono quelli più frequentemente riscontrati e presentano la probabilità più bassa di recidivare e di determinare la formazione di metastasi [1]. La maggioranza dei STS inclusi nello studio presentava un basso grado istologico (16/31, 51,6%), seguivano quelli di grado intermedio (10/31; 32,2%) e quelli di alto grado (5/31, 16,1%). Un elevato indice mitotico è stato associato a una maggiore propensione alla recidiva ed una maggiore precocità della stessa, allo sviluppo di metastasi e un ad un ridotto tempo di sopravvivenza [1]. Nel presente studio è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa nell'indice mitotico dei diversi istotipi di STS ($\rho = 0,01$) a supporto della teoria secondo cui le differenze nel comportamento degli istotipi possa essere spiegato da una maggiore propensione di alcune tipologie a presentarsi con un grado e/o un indice mitotico elevati [1]. In particolare, il confronto a coppie ha evidenziato che il gruppo dei FSA ha presentato un indice mitotico maggiore rispetto al gruppo dei PNST ($\rho = 0,049$) ed al il gruppo dei PWT ($\rho = 0,035$). Un ulteriore limite legato alla natura retrospettiva del presente studio è rappresentato dall'assenza di informazioni in merito alla recidiva locale, allo sviluppo di metastasi ed ai tempi di sopravvivenza a seguito della rimozione chirurgica.

Diverse fonti hanno evidenziato come i TAMs siano la tipologia cellulare più abbondante nel TME dei STS dell'uomo e che questi siano più frequentemente polarizzati M2 [38], [78], [79]. In uno studio basato su 38 STS del cane i TAMs Iba1+ hanno rappresentano dal 6% al 62% delle cellule nel campo microscopico (media = 21%) ed una correlazione positiva è stata osservata tra l'area occupata dai TAMs e l'indice mitotico [77]. Tuttavia, quest'ultimo lavoro non ha operato una distinzione tra i diversi istotipi di STS e non ha impiegato marker che consentissero la distinzione M1/M2. Nel presente studio il marker MAC387 è stato impiegato per l'identificazione dei TAMs M1. Le cellule macrofagiche MAC387+ hanno presentato una distinta morfologia istiocitoide con frequenti prolungamenti cellulari in contatto con le cellule neoplastiche. Hanno presentato MAC387+ intratumorali 13/29 casi (44,82%). I TAMs MAC387+ sono stati ritrovati sparsi all'interno del parenchima tumorale e occasionalmente in piccoli aggregati. La densità di MAC387+ ha presentato un ampia variabilità tra i casi inclusi (media= $5,04 \pm 3,1$ cellule/HPF; $\sigma =$ 17,12): la presenza di MAC387+ non è stata osservata in più della metà dei casi e i casi positivi hanno generalmente mostrato una densità bassa ad eccezione di 3/29 casi con una densità moderata-elevata. I macrofagi polarizzati M1 sono contraddistinti dalla produzione di citochine pro-infiammatorie, tra cui TNF α , INF γ IL-1 β , IL-6 e IL-12 che contribuiscono alla stimolazione della risposta immunitaria [48]. Concordemente, nel presente studio la densità di TAMs M1 MAC387+ ha mostrato una moderata correlazione positiva (Tabella 7) con la densità di diverse tipologie di TILs (CD20, MUM-1 e Foxp3). La densità di MAC387 ha mostrato una debole e non significativa correlazione con la densità di CD3+. Tuttavia, quest'ultimo dato deve essere analizzato alla luce del fatto che solamente 10 campioni sono stati sottoposti ad IHC per la ricerca dei CD3+. Risultati simili per i STS dell'uomo sono riportati in un lavoro di Deng et al. (2020) basato sull'analisi dei dati trascrittomici di 869 STS, il quale ha identificato tre classi caratterizzate da un distinto profilo immunitario: il gruppo A è stato caratterizzato da un' elevata infiltrazione di macrofagi M2 in associazione ad una scarsa presenza di CD4+, il gruppo B si è rivelato essere dominato dalla presenza di macrofagi non polarizzati M0 mentre il gruppo C, presentante un elevata infiltrazione di macrofagi M1, dimostrava anche una maggiore presenza di CD8+ e PCs [38]. Le correlazioni osservate nel presente studio suggeriscono che anche nei STS del cane i TAMs contribuiscano a modellare il TME di queste neoplasie e che i TAMs M1 promuovano lo sviluppo di una risposta immunitaria antitumorale favorendo il richiamo di diverse cellule dell'immunità adattativa. Al contrario, I TAMs M2 sono noti per la produzione di citochine antinfiammatorie quali IL-10 e TGF-\beta che contribuiscono allo spegnimento della risposta immunitaria contro le cellule tumorali [43], [48]. Diverse fonti indicano che i TAMs M2 costituiscono la tipologia cellulare maggiormente rappresentata nel TME dei STS dell'uomo [38]. Pertanto, future ricerche dovrebbero indagare la presenza di TAMs M2 nei STS del cane, il relativo effetto sulla composizione del TME ed il comportamento di queste neoplasie. Nel presente studio non sono state osservate differenze statisticamente significative nella densità di TAMs M1 tra STS di diverso grado. Tuttavia, sebbene in modo non significativo, i STS di grado basso $(8,3 \pm 5,69)$ cellule HPF, $\sigma = 22,76$) e intermedio (7,41 ± 6,27 cellule HPF, $\sigma = 2,27$) hanno mostrato una densità media di TAMs M1 maggiore rispetto a quelli di grado alto $(1,33 \pm 1,33)$ cellule/HPF, $\sigma = 2,3$). Inoltre, contrariamente a quanto riportato da Finotello et al. per i TAMs Iba1+ [77], non è stata evidenziata nessuna correlazione positiva con l'indice mitotico.

I TILs comprendono diverse tipologie cellulari quali principalmente CD4+, CD8+, Treg, linfociti B CD20+, PC e cellule NK [53]. Dati in merito al STS dell'uomo indicano che i STS caratterizzati da una maggiore infiltrazione di CD4+, CD8+ e CD20+ presentano una prognosi più favorevole rispetto a tumori immunologicamente inattivi [38]. Nel presente studio i marker CD3, Foxp3, CD20 e MUM-1 sono stati rispettivamente impiegati per ricerca di linfociti T, Treg, linfociti B e PCs. I linfociti T CD3+ comprendono sia i linfociti Th che i CTLs i quali sono considerati i principali attori della risposta antitumorale essendo rispettivamente deputati all'attivazione delle cellule effettrici mediante la produzione di citochine ed alla lisi diretta delle cellule neoplastiche [45]. Hanno presentato CD3+ intratumorali 7/10 casi (70%) con una densità ampiamente variabile tra i casi analizzati (media = $52 \pm 41,2$ cellule/HPF; $\sigma = 130,30$). Nel presente studio non è stato possibile impiegare marker utili alla identificazione dei Th e dei CTLs. Studi futuri dovrebbero essere mirati a distinguere le diverse sottopopolazioni di linfociti T al fine caratterizzare ulteriormente il TME di queste neoplasie. La presenza di linfociti B è stata associata ad

un'aumentata sopravvivenza nei STS dell'uomo indipendentemente dalla contemporanea presenza di linfociti CD8+. Inoltre, la presenza di cellule B è risultata essere predittiva di una migliore risposta al trattamento con ICIs [38], [75], [79]. Nel presente studio, i linfociti B CD20+ intratumorali sono stati osservati in 16/31 (51%) casi con una densità ampiamente variabile (media= 5,68 \pm 2,6 cellule/HPF; σ = 14,49). I Treg sono noti per la loro azione pro-tumorale dovuta alla produzione di citochine immuno-soppressive quali IL-10, IL-35 e TGFB che determinano la soppressione della risposta immunitaria antitumorale [45], [64]. La presenza di Treg nel TME dei STS dell'uomo è stata descritta da diversi autori e la stessa sembra essere predittiva di un aumentato rischio di recidiva locale [38], [80]. La presenza di Treg nei STS del cane non è mai stata investigata. Tuttavia, uno studio riporta una quantità significativamente maggiore di Treg circolanti in cani affetti da STS [76]. Nel presente studio i Treg sono stati rilevati nel parenchima tumorale di 7/31 STS (22,6%) con una densità bassa se paragonata a quella di altre tipologie di cellule immunitarie (media= 0.56 ± 0.32 cellule/HPF; $\sigma = 1.81$). Tuttavia, tale dato deve essere interpretato tenendo conto che i Treg rappresentano normalmente una parte minoritaria del totale dei linfociti T CD3+. La presenza di Treg Foxp3+ nei STS del cane suggerisce che questi possano rappresentare un potenziale meccanismo di evasione immunitaria sfruttato da queste neoplasie. Ulteriori studi sono necessari per definire l'impatto prognostico di quest'ultimi sul comportamento dei STS del cane. La presenza di PC è stata associata ad una prognosi più favorevole in diverse tipologie tumorali dell'uomo e alcune analisi suggeriscono che le PC abbiano un significato prognostico più forte rispetto ai linfociti B [72]. Nel presente studio 3/31 STS hanno mostrato la presenza di PCs MUM-1+ infiltrate all'interno del tessuto neoplastico e raggruppate all'interno di densi aggregati linfocitari. Le densità delle diverse tipologie di TILs hanno mostrato tra loro correlazioni positive statisticamente significative (Tabella 7). I CD3+ hanno presentato una moderata correlazione positiva con i CD20+, con le PCs MUM-1+ ed una forte correlazione positiva con i Foxp3. Quest'ultimi hanno mostrato una moderata correlazione positiva sia con i CD20+ le cellule MUM-1+. Nessuna differenza statisticamente significativa nella densità dei TILs è stata osservata in STS di diverso grado e nemmeno l'indice mitotico ha mostrato alcuna correlazione con nessuna delle tipologie di TILs.

La composizione del TME di STS dell'uomo ha mostrato differenze sostanziali in base agli istotipi [38]. Pertanto, è ipotizzabile che anche nei STS del cane i diversi istotipi presentino una distinta composizione del TME e che la stessa possa contribuire alle differenze nel comportamento di queste neoplasie. Tuttavia, probabilmente a causa della scarsa numerosità di alcune tipologie di STS, il presente studio non ha individuato alcuna differenza statisticamente significativa nella

composizione del TME dei diversi istotipi. Studi futuri beneficerebbero dell'inclusione di un numero maggiore di casi di determinati istotipi. Nel presente studio non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa nella densità di MAC387+, CD20+, MUM-1+, CD3+ e Foxp3+ tra STS di diverso grado, differenziazione e con diversa estensione della necrosi. Nessuna correlazione è stata osservata tra l'indice mitotico e la densità delle diverse cellule immunitarie. Sebbene un lavoro di Vascellari et al. riporti una maggiore infiltrazione di cellule immunitarie nei FSA originanti a livello di possibili siti di iniezione [25], nel presente studio la localizzazione del STS non ha avuto alcuna influenza sulla densità delle diverse cellule immunitarie.

I risultati del presente studio indicano che, benché la maggior parte dei STS presenti una infiltrazione nulla o scarsa di cellule immunitarie, una parte minoritaria dei STS è accompagnata da una marcata attivazione della risposta immunitaria caratterizzata dalla presenza di abbondanti TAMs M1 MAC387+, linfociti T CD3+, linfociti B CD20+ e PCs MUM-1+. Quest'ultimi casi sono stati caratterizzati dalla presenza di densi aggregati perivascolari riproducenti l'organizzazione strutturale degli organi linfoidi secondari e interpretati come TLSs (Figura 14). Nelle TLSs le DCs, i linfociti T e B interagiscono tra loro dando luogo diversi meccanismi antitumorali, tra cui l'attivazione e l'espansione clonale di cellule effettrici, la produzione di anticorpi e lo switch fenotipico anticorpale [45]. Nel presente studio, tali strutture sono state osservate sia in sede intra-tumorale che in prossimità dei margini e hanno presentato una zona ricca di cellule T CD3+ in associazione a un centro germinativo di cellule B spesso in prossimità di PCs MUM-1+. Le TLSs osservate nei casi oggetto di studio si sono presentate a diversi stadi maturativi variando da densi aggregati linfocitari fino a strutture simil-follicolari ben organizzate e presentanti centri germinativi primari o secondari. Inoltre, le TLSs sono state ritrovate in stretta vicinanza di strutture vascolari caratterizzate dalla presenza di cellule endoteliali di forma cubica e interpretate come HEVs. Analogamente, il SIC (Sarcoma Immune Classification) proposto da Petitprez et al. per i STS dell'uomo ha evidenziato come i tumori presentanti la maggiore infiltrazione di cellule immunitarie siano caratterizzati dalla maggiore espressione di CXCL13 e dalla presenza di TLSs suggerendo che queste strutture siano fondamentali per la genesi di una risposta immunitaria antitumorale. Inoltre, la presenza di TLSs è risultata essere un fattore predittivo per la risposta al trattamento con ICIs [75]. Tuttavia, la presenza di Treg all'interno di tali strutture è stata dimostrata influenzare negativamente la capacità delle stesse di generare un'efficace risposta immunitaria a seguito del trattamento con ICIs [81]. Nel presente studio i Treg sono spesso stati ritrovati all'interno di TLSs, ma rappresentando una piccola parte dei CD3+.

Conclusioni

Il presente studio costituisce il primo tentativo di caratterizzazione estensiva dei microambiente immunitario dei STS del cane. I risultati indicano che, sebbene i STS del cane presentino generalmente una scarsa immunogenicità, alcuni casi sono caratterizzati da un'infiltrazione più o meno abbondante di cellule immunitarie con funzione antitumorale. I TAMs M1 hanno mostrato una distribuzione diffusa all'interno del tessuto neoplastico, mentre i TILs sono stati osservati principalmente in sede perivascolare. La densità dei TAMs M1 ha mostrato una correlazione positiva con la densità di linfociti B e PCs suggerendo che i TAMs condizionino la genesi di un'efficace risposta immunitaria antitumorale nei STS del cane. L'osservazione di Treg infiltranti i STS consente di ipotizzare che questi possano rappresentare un possible meccanismo di evasione immunitaria in queste neoplasie. I STS caratterizzati da un'elevata infiltrazione di cellule immunitarie si sono distinti per la presenza di densi aggregati linfocitari con una struttura simil follicolare interpretate come TLSs. Non sono state individuate differenze significative nella composizione del TME di STS di diverso grado e non sono state osservate correlazioni con l'indice mitotico. Tali risultati sono compatibili con le conoscenze in merito ai STS dell'uomo e supportano il potenziale impiego dei STS del cane come modello spontaneo per lo studio del TME di queste neoplasie e lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici a favore di entrambe le specie. Ulteriori ricerche dovrebbero essere finalizzate a valutare l'effetto della composizione del TME sulla recidiva locale, lo sviluppo di metastasi e la sopravvivenza complessiva. Inoltre, data l'elevata eterogeneità della classe dei STS, una particolare attenzione dovrebbe essere rivolta allo studio di eventuali differenze nella composizione del TME di istotipi distinti.

Bibliografia

- M. M. Dennis, K. D. McSporran, N. J. Bacon, F. Y. Schulman, R. A. Foster, and B. E. Powers, 'Prognostic factors for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in dogs', *Vet Pathol*, vol. 48, no. 1, pp. 73–84, 2011, doi: 10.1177/0300985810388820.
- F. L. Liptak JM, Soft tissue sarcomas. Small Animal Clinical Oncology, ed. Withrow SJ and Vail DM, 6th ed., pp. 404–431. St Louis, MO, Sanders Elsevier, 2019.
- [3] A. L. Martins, A. Canadas-Sousa, J. R. Mesquita, P. Dias-Pereira, I. Amorim, and F. Gärtner, 'Retrospective study of canine cutaneous tumors submitted to a diagnostic pathology laboratory in Northern Portugal (2014-2020).', *Canine Med Genet*, vol. 9, no. 1, p. 2, Feb. 2022, doi: 10.1186/s40575-022-00113-w.
- [4] M. K. Kok *et al.*, 'Retrospective study of canine cutaneous tumors in Japan, 2008-2017', *J. Vet. Med. Sci*, vol. 81, no. 8, pp. 1133–1143, 2019, doi: 10.1292/jvms.19-0248.
- [5] 1 Eva Hellmén, Helena Willén, Guy C. M. Grinwis, Erik Teske, Gerard R. Rutteman Kim
 M. Boerkamp, 'Unclassified sarcomas: a study to improve classification in a cohort of Golden Retriever dogs', 2016, doi: 10.1177/1040638716660130.
- [6] J. M. Dobson, S. Samuel, H. Milstein, K. Rogers, and J. L. N. Wood, 'Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs', *Journal of Small Animal Practice*, vol. 43, no. 6, pp. 240–246, Jun. 2002, doi: 10.1111/J.1748-5827.2002.TB00066.X.
- [7] J. P. Bray, 'Soft tissue sarcoma in the dog part 1: a current review', *Journal of Small Animal Practice*, vol. 57, no. 10. Blackwell Publishing Ltd, pp. 510–519, Oct. 01, 2016. doi: 10.1111/jsap.12556.
- [8] K. M. Boerkamp, E. Hellmén, H. Willén, G. C. M. Grinwis, E. Teske, and G. R. Rutteman, 'Unclassified sarcomas: a study to improve classification in a cohort of Golden Retriever dogs', *J Vet Diagn Invest*, vol. 28, no. 6, pp. 623–631, Nov. 2016, doi: 10.1177/1040638716660130.
- K. D. McSporran, 'Histologic grade predicts recurrence for marginally excised canine subcutaneous soft tissue sarcomas', *Vet Pathol*, vol. 46, no. 5, pp. 928–933, Sep. 2009, doi: 10.1354/VP.08-VP-0277-M-FL.
- [10] L. Lam *et al.*, 'Comparative whole transcriptome analysis of gene expression in three canine soft tissue sarcoma types', *PLoS One*, vol. 17, no. 9, Sep. 2022, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0273705.

- [11] J. P. Bray, G. A. Polton, K. D. Mcsporran, J. Bridges, and T. M. Whitbread, 'Canine soft tissue sarcoma managed in first opinion practice: Outcome in 350 cases', *Veterinary Surgery*, vol. 43, no. 7, pp. 774–782, Oct. 2014, doi: 10.1111/j.1532-950X.2014.12185.x.
- [12] N. Ehrhart, 'Soft-tissue sarcomas in dogs: a review', *J Am Anim Hosp Assoc*, vol. 41, no. 4, pp. 241–246, 2005, doi: 10.5326/0410241.
- [13] J. Radons, 'Inflammatory stress and sarcomagenesis: a vicious interplay', doi: 10.1007/s12192-013-0449-4.
- [14] M. Barnes, P. Duray, A. Deluca, W. Anderson, W. Sindelar, and T. Kinsella, 'Tumor induction following intraoperative radiotherapy: late results of the National Cancer Institute canine trials', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, vol. 19, no. 3, pp. 651–660, 1990, doi: 10.1016/0360-3016(90)90492-3.
- [15] P. A. S. Johnstone, W. B. Laskin, A. M. Deluca, M. Barnes, T. J. Kinsella, and W. F. Sindelar, 'Tumors in dogs exposed to experimental intraoperative radiotherapy', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, vol. 34, no. 4, pp. 853–857, Mar. 1996, doi: 10.1016/0360-3016(95)02118-3.
- [16] M. C. McEntee, R. L. Page, A. Théon, H. N. Erb, and D. E. Thrall, 'Malignant tumor formation in dogs previously irradiated for acanthomatous epulis', *Veterinary Radiology and Ultrasound*, vol. 45, no. 4, pp. 357–361, Jul. 2004, doi: 10.1111/j.1740-8261.2004.04067.x.
- P. E. McCarthy, C. S. Hedlund, R. S. Veazy, J. Prescott-Mathews, and D. Y. Cho, 'Liposarcoma associated with a glass foreign body in a dog', *J Am Vet Med Assoc*, vol. 209, no. 3, pp. 612–614, Aug. 1996, Accessed: Apr. 10, 2023. [Online]. Available: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8755980/
- [18] M. Vascellari, F. Mutinelli, R. Cossettini, and E. Altinier, 'Liposarcoma at the site of an implanted microchip in a dog', *Veterinary Journal*, vol. 168, no. 2, pp. 188–190, Sep. 2004, doi: 10.1016/S1090-0233(03)00121-7.
- [19] J. L. Haddad, M. H. Goldschmidt, and R. T. Patel, 'Fibrosarcoma arising at the site of a retained surgical sponge in a cat', *Vet Clin Pathol*, vol. 39, no. 2, pp. 241–246, Jun. 2010, doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00209.x.
- [20] E. L. Rayner, C. L. Scudamore, I. Francis, and S. Schöniger, 'Abdominal fibrosarcoma associated with a retained surgical swab in a dog', *J Comp Pathol*, vol. 143, no. 1, pp. 81– 85, Jul. 2010, doi: 10.1016/J.JCPA.2009.12.009.

- [21] M. Vascellari, E. Melchiotti, and F. Mutinelli, 'Fibrosarcoma with Typical Features of Postinjection Sarcoma at Site of Microchip Implant in a Dog: Histologic and Immunohistochemical Study', 2006. [Online]. Available: www.avma.org/vafstf.
- [22] C. Porras-Silesky *et al.*, 'pathogens Spirocerca lupi Proteomics and Its Role in Cancer Development: An Overview of Spirocercosis-Induced Sarcomas and Revision of Helminth-Induced Carcinomas', 2021, doi: 10.3390/pathogens10020124.
- [23] L. L. van der Merwe, R. M. Kirberger, S. Clift, M. Williams, N. Keller, and V. Naidoo, 'Spirocerca lupi infection in the dog: A review', *The Veterinary Journal*, vol. 176, no. 3, pp. 294–309, Jun. 2008, doi: 10.1016/J.TVJL.2007.02.032.
- [24] M. Martano, E. Morello, and P. Buracco, 'Feline injection-site sarcoma: past, present and future perspectives', *Vet J*, vol. 188, no. 2, pp. 136–141, May 2011, doi: 10.1016/J.TVJL.2010.04.025.
- [25] M. Vascellari, E. Melchiotti, M. A. Bozza, and F. Mutinelli, 'Fibrosarcomas at presumed sites of injection in dogs: characteristics and comparison with non-vaccination site fibrosarcomas and feline post-vaccinal fibrosarcomas', *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, vol. 50, no. 6, pp. 286–291, Aug. 2003, doi: 10.1046/J.1439-0442.2003.00544.X.
- [26] P. F. Moore, 'A Review of Histiocytic Diseases of Dogs and Cats', *Vet Pathol*, vol. 51, no. 1, pp. 167–184, Jan. 2014, doi: 10.1177/0300985813510413.
- [27] S. Sisó, P. Marco-Salazar, P. Roccabianca, G. Avallone, R. J. Higgins, and V. K. Affolter, 'Nerve Fiber Immunohistochemical Panel Discriminates between Nerve Sheath and Perivascular Wall Tumors', *Veterinary Sciences 2023, Vol. 10, Page 1*, vol. 10, no. 1, p. 1, Dec. 2022, doi: 10.3390/VETSCI10010001.
- [28] Donald J. Meuten, *Tumors in Domestic Animals*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2016. doi: 10.1002/9781119181200.
- [29] Y. Iwaki, S. Lindley, A. Smith, K. M. Curran, and J. Looper, 'Canine myxosarcomas, a retrospective analysis of 32 dogs (2003-2018)', *BMC Vet Res*, vol. 15, no. 1, Jun. 2019, doi: 10.1186/S12917-019-1956-Z.
- [30] G. Avallone *et al.*, 'Histological Classification and Immunohistochemical Evaluation of MDM2 and CDK4 Expression in Canine Liposarcoma', *Vet Pathol*, vol. 53, no. 4, pp. 773– 780, Jul. 2016, doi: 10.1177/0300985815626573.
- [31] G. Avallone, D. Stefanello, R. Ferrari, and P. Roccabianca, 'The controversial histologic classification of canine subcutaneous whorling tumours: The path to perivascular wall tumours.', *Vet Comp Oncol*, vol. 18, no. 1, pp. 3–8, Mar. 2020, doi: XCFjURQa.

- [32] G. Avallone, P. Helmbold, M. Caniatti, D. Stefanello, R. C. Nayak, and P. Roccabianca, 'The spectrum of canine cutaneous perivascular wall tumors: morphologic, phenotypic and clinical characterization', *Vet Pathol*, vol. 44, no. 5, pp. 607–620, Sep. 2007, doi: 10.1354/VP.44-5-607/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1354_VP.44-5-607-FIG2.JPEG.
- [33] J. P. Bray, G. A. Polton, K. D. Mcsporran, J. Bridges, and T. M. Whitbread, 'Canine soft tissue sarcoma managed in first opinion practice: Outcome in 350 cases', *Veterinary Surgery*, vol. 43, no. 7, pp. 774–782, Oct. 2014, doi: 10.1111/j.1532-950X.2014.12185.x.
- [34] G. Avallone *et al.*, 'Review of Histological Grading Systems in Veterinary Medicine.', *Vet Pathol*, vol. 58, no. 5, pp. 809–828, 2021, doi: 10.1177/0300985821999831.
- [35] F. W. Yap, R. Rasotto, S. L. Priestnall, K. J. Parsons, and J. Stewart, 'Intra- and interobserver agreement in histological assessment of canine soft tissue sarcoma', *Vet Comp Oncol*, vol. 15, no. 4, pp. 1553–1557, Dec. 2017, doi: 10.1111/VCO.12300.
- [36] K. D. McSporran, 'Histologic grade predicts recurrence for marginally excised canine subcutaneous soft tissue sarcomas', *Vet Pathol*, vol. 46, no. 5, pp. 928–933, Sep. 2009, doi: 10.1354/vp.08-VP-0277-M-FL.
- [37] S. A. Hoda, 'Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors', *Am J Clin Pathol*, vol. 154, no. 3, pp. 424–424, Aug. 2020, doi: 10.1093/AJCP/AQAA078.
- [38] M. Roulleaux Dugage, E. F. Nassif, A. Italiano, and R. Bahleda, 'Improving Immunotherapy Efficacy in Soft-Tissue Sarcomas: A Biomarker Driven and Histotype Tailored Review', *Front Immunol*, vol. 12, Dec. 2021, doi: 10.3389/FIMMU.2021.775761.
- [39] J. D. Schiffman and M. Breen, 'Comparative oncology: What dogs and other species can teach us about humans with cancer', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 370, no. 1673. Royal Society of London, Jul. 19, 2015. doi: 10.1098/rstb.2014.0231.
- [40] M. Milovancev, M. Hauck, C. Keller, L. W. Stranahan, A. Mansoor, and D. E. Malarkey, 'Comparative Pathology of Canine Soft Tissue Sarcomas: Possible Models of Human Nonrhabdomyosarcoma Soft Tissue Sarcomas', *J Comp Pathol*, vol. 152, no. 1, pp. 22–27, Jan. 2015, doi: 10.1016/J.JCPA.2014.09.005.
- [41] D. Hanahan and R. A. Weinberg, 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011, doi: 10.1016/J.CELL.2011.02.013.
- [42] B. Arneth, 'Tumor Microenvironment', *Medicina (Kaunas)*, vol. 56, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.3390/MEDICINA56010015.

- [43] X. Lei *et al.*, 'Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy', *Cancer Lett*, vol. 470, pp. 126–133, Feb. 2020, doi: 10.1016/J.CANLET.2019.11.009.
- [44] M. Hansen and M. H. Andersen, 'The role of dendritic cells in cancer', doi: 10.1007/s00281-016-0592-y.
- [45] S. T. Paijens, A. Vledder, M. de Bruyn, and H. W. Nijman, 'Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era', *Cell Mol Immunol*, vol. 18, no. 4, p. 842, Apr. 2021, doi: 10.1038/S41423-020-00565-9.
- [46] S. K. Wculek, F. J. Cueto, A. M. Mujal, I. Melero, M. F. Krummel, and D. Sancho, 'Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy', doi: 10.1038/s41577-019-0210-z.
- [47] J. Goc *et al.*, 'Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells', *Cancer Res*, vol. 74, no. 3, pp. 705–715, Feb. 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1342.
- [48] Y. Pan, Y. Yu, X. Wang, and T. Zhang, 'Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity.', *Front Immunol*, vol. 11, p. 583084, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.583084.
- [49] R. V. Brady and D. H. Thamm, 'Tumor-associated macrophages: Prognostic and therapeutic targets for cancer in humans and dogs', *Front Immunol*, vol. 14, 2023, doi: 10.3389/FIMMU.2023.1176807.
- [50] I. Porcellato *et al.*, 'Tumor-Associated Macrophages in Canine Oral and Cutaneous Melanomas and Melanocytomas: Phenotypic and Prognostic Assessment', *Front Vet Sci*, vol. 9, Jul. 2022, doi: 10.3389/FVETS.2022.878949.
- [51] S. Vázquez, R. Vallejo, J. Espinosa, N. Arteche, J. A. Vega, and V. Pérez, 'Immunohistochemical Characterization of Tumor-Associated Macrophages in Canine Lymphomas', *Animals*, vol. 11, no. 8, p. 2301, Aug. 2021, doi: 10.3390/ani11082301.
- [52] S. Yokota, K. Kaji, T. Yonezawa, Y. Momoi, and S. Maeda, 'CD204⁺ tumor-associated macrophages are associated with clinical outcome in canine pulmonary adenocarcinoma and transitional cell carcinoma', *Vet J*, vol. 296–297, Jun. 2023, doi: 10.1016/J.TVJL.2023.105992.
- [53] I. Porcellato *et al.*, 'Tumour-infiltrating lymphocytes in canine melanocytic tumours: An investigation on the prognostic role of CD3 + and CD20 + lymphocytic populations', 2019, doi: 10.1111/vco.12556.

- [54] W. X. Huff, J. H. Kwon, M. Henriquez, K. Fetcko, and M. Dey, 'Molecular Sciences The Evolving Role of CD8 + CD28 – Immunosenescent T Cells in Cancer Immunology', 2019, doi: 10.3390/ijms20112810.
- [55] S. S. Withers *et al.*, 'Association of macrophage and lymphocyte infiltration with outcome in canine osteosarcoma', *Vet Comp Oncol*, vol. 17, no. 1, pp. 49–60, Mar. 2019, doi: 10.1111/VCO.12444.
- [56] V. R. Costa *et al.*, 'Exploring the association of intratumoral immune cell infiltrates with histopathologic grade in canine mast cell tumors', *Res Vet Sci*, vol. 147, pp. 83–91, Oct. 2022, doi: 10.1016/J.RVSC.2022.04.005.
- [57] M. K. Boss, L. G. Harrison, A. Gold, S. D. Karam, and D. P. Regan, 'Canine oral squamous cell carcinoma as a spontaneous, translational model for radiation and immunology research', *Front Oncol*, vol. 12, Jan. 2023, doi: 10.3389/FONC.2022.1033704.
- [58] L. B. Boozer, T. W. Davis, L. B. Borst, K. M. Zseltvay, N. J. Olby, and C. L. Mariani, 'Characterization of Immune Cell Infiltration Into Canine Intracranial Meningiomas', *Vet Pathol*, vol. 49, no. 5, pp. 784–795, Sep. 2012, doi: 10.1177/0300985811417249/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0300985811417249-FIG2.JPEG.
- [59] S. J. Judge *et al.*, 'Analysis of tumor-infiltrating NK and T cells highlights IL-15 stimulation and TIGIT blockade as a combination immunotherapy strategy for soft tissue sarcomas', J Immunother Cancer, vol. 8, no. 2, Nov. 2020, doi: 10.1136/JITC-2020-001355.
- [60] J. A. Lenz *et al.*, 'Increased tumor-infiltrating lymphocyte density is associated with favorable outcomes in a comparative study of canine histiocytic sarcoma', *Cancer Immunol Immunother*, vol. 71, no. 4, pp. 807–818, Apr. 2022, doi: 10.1007/S00262-021-03033-Z.
- [61] K. Saeki, Y. Endo, K. Uchida, R. Nishimura, N. Sasaki, and T. Nakagawa, 'Significance of Tumor-Infiltrating Immune Cells in Spontaneous Canine Mammary Gland Tumor: 140 Cases', J. Vet. Med. Sci, vol. 74, no. 2, pp. 227–230, 2012, doi: 10.1292/jvms.11-0118.
- [62] A. Estrela-Lima *et al.*, 'Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates', *BMC Cancer*, vol. 10, Jun. 2010, doi: 10.1186/1471-2407-10-256.
- [63] M. S. Franzoni *et al.*, 'Tumor-infiltrating CD4+ and CD8+ lymphocytes and macrophages are associated with prognostic factors in triple-negative canine mammary complex type carcinoma', *Res Vet Sci*, vol. 126, pp. 29–36, Oct. 2019, doi: 10.1016/J.RVSC.2019.08.021.

- [64] K. Sakai *et al.*, 'Association of tumour-infiltrating regulatory T cells with adverse outcomes in dogs with malignant tumours', *Vet Comp Oncol*, vol. 16, no. 3, pp. 330–336, Sep. 2018, doi: 10.1111/VCO.12383.
- [65] J. D. Murphy et al., 'Characterization of expression and prognostic implications of transforming growth factor beta, programmed death-ligand 1, and T regulatory cells in canine histiocytic sarcoma', *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 257, p. 110560, Mar. 2023, doi: 10.1016/J.VETIMM.2023.110560.
- [66] V. R. Costa *et al.*, 'Exploring the association of intratumoral immune cell infiltrates with histopathologic grade in canine mast cell tumors', *Res Vet Sci*, vol. 147, pp. 83–91, Oct. 2022, doi: 10.1016/J.RVSC.2022.04.005.
- [67] G. A. Krane *et al.*, 'Immunohistochemical evaluation of immune cell infiltration in canine gliomas', *Vet Pathol*, vol. 58, no. 5, pp. 952–963, Sep. 2021, doi: 10.1177/03009858211023946.
- [68] D. P. Castro *et al.*, 'Expression of FOXP3 in canine gliomas: Immunohistochemical study of tumor-infiltrating regulatory lymphocytes', *J Neuropathol Exp Neurol*, vol. 79, no. 2, pp. 184–193, Feb. 2020, doi: 10.1093/jnen/nlz120.
- [69] S. S. Withers *et al.*, 'Metastatic immune infiltrates correlate with those of the primary tumour in canine osteosarcoma', *Vet Comp Oncol*, vol. 17, no. 3, pp. 242–252, 2019, doi: 10.1111/VCO.12459.
- [70] K. O'neill, A. Guth, B. Biller, R. Elmslie, and S. Dow, 'Changes in Regulatory T Cells in Dogs with Cancer and Associations with Tumor Type', 2009, doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0333.x.
- [71] A. M. Razmara *et al.*, 'Natural Killer and T Cell Infiltration in Canine Osteosarcoma: Clinical Implications and Translational Relevance', *Front Vet Sci*, vol. 8, Nov. 2021, doi: 10.3389/FVETS.2021.771737.
- [72] M. C. A. Wouters and B. H. Nelson, 'Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer', 2018, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1481.
- [73] T. Tsujikawa *et al.*, 'Prognostic significance of spatial immune profiles in human solid cancers', 2020, doi: 10.1111/cas.14591.
- [74] G. Giambrone *et al.*, 'Does TLS Exist in Canine Mammary Gland Tumours? Preliminary Results in Simple Carcinomas', 2022, doi: 10.3390/vetsci9110628.
- [75] F. Petitprez *et al.*, 'B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma', *Nature*, vol. 577, no. 7791, pp. 556–560, Jan. 2020, doi: 10.1038/S41586-019-1906-8.

- [76] M. J. Atherton, J. A. Lenz, and N. J. Mason, 'Sarcomas—A barren immunological wasteland or field of opportunity for immunotherapy?', *Vet Comp Oncol*, vol. 18, no. 4, pp. 447–470, Dec. 2020, doi: 10.1111/VCO.12595.
- [77] R. Finotello, K. Whybrow, G. Scarin, and L. Ressel, 'Correlation between Tumour Associated Macrophage (TAM) Infiltration and Mitotic Activity in Canine Soft Tissue Sarcomas.', *Animals (Basel)*, vol. 11, no. 3, Mar. 2021, doi: 10.3390/ani11030684.
- [78] L. Chen *et al.*, 'The Immunosuppressive Niche of Soft-Tissue Sarcomas is Sustained by Tumor-Associated Macrophages and Characterized by Intratumoral Tertiary Lymphoid Structures', *Clinical Cancer Research*, vol. 26, no. 15, pp. 4018–4030, Aug. 2020, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3416.
- H. Nyström, M. Jönsson, M. Nilbert, and A. Carneiro, 'Immune-cell infiltration in high-[79] grade soft tissue sarcomas; prognostic implications of tumor-associated macrophages and B-cells', Acta Oncol, vol. 62, no. 1, pp. 33-39, Jan. 2023, doi: 10.1080/0284186X.2023.2172688.
- [80] M. A. Smolle *et al.*, 'T-regulatory cells predict clinical outcome in soft tissue sarcoma patients: a clinico-pathological study', *Br J Cancer*, vol. 125, no. 5, pp. 717–724, Aug. 2021, doi: 10.1038/S41416-021-01456-0.
- [81] F. Peyraud *et al.*, 'Abstract 2578: High regulatory T cells infiltrate within tertiary lymphoid structure restricts response to immune checkpoint blockers in sarcomas', *Cancer Res*, vol. 82, no. 12_Supplement, pp. 2578–2578, Jun. 2022, doi: 10.1158/1538-7445.AM2022-2578.