

INDIVIDUAZIONE DI FATTORI PROGNOSTICI E PREDITTIVI NEL CARCINOMA DELLA MAMMELLA TRIPLO NEGATIVO MEDIANTE LO STUDIO DELLE CTC, DEL DNA LIBERO CIRCOLANTE E DEL TESSUTO TUMORALE PRIMITIVO ATTRAVERSO METODICHE DI *NEXT GENERATION SEQUENCING*

ABSTRACT

Il tumore della mammella (*breast cancer*, BC) è uno dei tumori con maggiore incidenza. Nonostante il progresso della ricerca e della medicina oncologica nel controllo di questa malattia, ancora il 20-25% delle pazienti con tumore in fase III hanno una recidiva entro 5 anni dalla diagnosi. I principali parametri clinici ed i marcatori istopatologici, come i recettori per l'estrogeno, per il progesterone e per il fattore di crescita epidermico umano (HER2), in associazione al fattore di crescita cellulare Ki-67, sono fondamentali per la definizione della prognosi e per la scelta delle strategie terapeutiche ma non riflettono ancora del tutto la complessità di tale patologia.

Il carcinoma mammario triplo negativo (TNBC) è caratterizzato dall'assenza di espressione di recettori per gli estrogeni, per il progesterone e dall'assenza di amplificazione di HER2. Le donne che ne sono affette presentano un rischio maggiore di recidiva precoce ed una prognosi più sfavorevole rispetto agli altri sottotipi, anche in presenza di una iniziale risposta alla terapia. È ritenuta sempre più urgente una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che stanno alla base dell'aggressività di questo tumore e l'identificazione di nuovi ed efficienti bersagli terapeutici.

Le cellule tumorali circolanti (CTC) sono cellule che si distaccano dal tumore primario per riversarsi nel sangue periferico costituendo così il principale veicolo per la disseminazione della malattia. Recenti studi hanno rilevato la loro presenza anche nelle fasi precoci del tumore e sono state associate ad un aumentato rischio di recidiva della malattia. Ci sono evidenze secondo le quali queste cellule giocano un ruolo prognostico e sono capaci di dare una previsione della risposta alla terapia. L'analisi delle CTC e del loro profilo molecolare potrebbe risultare quindi molto importante per la comprensione dei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo del tumore e per l'identificazione di nuovi target terapeutici.

La presenza di DNA libero circolante (*cell free DNA*, cfDNA) nel plasma è stata rilevata per la prima volta nel 1948, attirando così l'attenzione dei ricercatori come nuova possibile fonte di informazioni cliniche, in particolare come potenziale marcatore per la diagnosi di diversi tumori. Dall'analisi del ctDNA è possibile identificare mutazioni correlate al tumore che possono sia confermare una diagnosi, sia predire la risposta positiva o negativa ad una terapia. Inoltre è possibile identificare nuove mutazioni che potrebbero rappresentare nuovi possibili *target* di terapie bersaglio.

CTC e ctDNA, sono i componenti fondamentali della cosiddetta biopsia liquida. Negli ultimi 10 anni, la biopsia liquida ha suscitato notevole attenzione come metodo non invasivo di analisi ed identificazione di specifiche mutazioni per la diagnosi e monitoraggio della malattia in pazienti affetti da tumore. I principali obiettivi di questo studio di fattibilità sono:

1. Comparare i profili molecolari delle CTC e del ctDNA, con le caratteristiche del tessuto tumorale primitivo di 12 pazienti con tumore alla mammella e valutare il livello di concordanza, per comprendere la validità della liquid biopsy nella diagnosi e nel monitoraggio della malattia.

2. Verificare la presenza di singole mutazioni o pattern di alterazioni geniche riconducibili all'aggressività del tumore triplo negativo o che potrebbero essere utilizzati come bersagli terapeutici per terapie target.

STATO DELL'ARTE

Ad oggi è stato estratto e purificato il materiale genetico (DNA) da tutte e tre le fonti biologiche, per l'intera casistica di 12 pazienti, 6 affette da TNBC e 6 da BC luminal A. Inoltre sono stati recuperati tutti i parametri clinici di diagnosi e *follow-up*, ad oggi presenti in archivio.

N pz	V. Inv.	Proliferation (≥20%)	Dimensions ≥ 2 cm	LN+ (1/2)	TN	Grade	Hystotype	Her-2	ER	PgR	MIB1 (%)	
7	\	1	\	\	1	3	Ductal inf.	\	0	0	45	
23	1	1	\	1	1	3	Ductal	\	0	0	85	NED
25	\	1	\	1	1	3	Ductal inf.	\	0	0	60	NED
27	\	1	1	\	1	3	Ductal inf.	\	0	0	80	NED
35	1	1	1	\	1	3	Ductal inf.	\	0	0	55	PR
46	1	1	1	1	1	3	Ductal inf.	\	0	0	75	NED

N pz	V. Inv.	Proliferation (≥20%)	Dimensions ≥ 2 cm	LN+ (1/2)	TN	Grade	Hystotype	Her-2	ER	PgR	MIB1 (%)	
31	\	\	\	\	\		Ductal inf. m.	\	100	25	10	NED
32	\	\	1	\	\	2	Lobular	\	100/0	100/5	15	NED
37	\	\	1	\	\	2	Ductal	\	100	100	10	NED
41	\	\	\	\	\	1	Ductal inf.	\	100	80	5	NED
43	1	1	1	1	\	3	Ductal inf.	\	90	100	25	NED
45	1	\	\	\	\	2	Ductal inf.	\	100	100	15	NED

Tabella 1: Caratteristiche cliniche delle pazienti arruolate (ER recettore per estrogeni, PgR recettore per progesterone, MIB1 indice di proliferazione, NED *no evidence of disease*, PR *partial response*)

I campioni di tessuto primitivo FFPE e plasma sono stati processati tramite protocolli specifici e sviluppati *ad hoc* per ottenere la massima quantità e qualità del materiale estratto. Le CTC selezionate su base morfologica (dimensione della cellula, stato del nucleo) e per la positività a marcatori epiteliali (EpCAM e CKs) sono state processate per l'estrazione e l'amplificazione del DNA da singola cellula tramite metodica *Whole Genome Amplification* (WGA). Il kit di estrazione e di amplificazione utilizzato, *WGA Ampli1* specifico per metodica singola cellula, ha la peculiarità di mantenere bilanciata la rappresentatività dell'intero genoma amplificato. Il prodotto di WGA è stato poi sottoposto all'analisi qualitativa per valutare la bontà del materiale genetico su cui effettuare l'analisi in NGS.

ATTIVITÀ FUTURE:

1. Analisi del *Copy Number Variations* (CNV) su singola cellula tramite kit LowPass, specifico per prodotti di *WGA Ampli1*. Questo è un test che valuta il bilanciamento dell'intero genoma della cellula (intero corredo cromosomico) valutando la presenza di amplificazioni e/o delezioni di interesse cromosomiche, caratteristica peculiare delle cellule tumorali. Questo permetterà di determinare la reale natura cancerosa delle CTC recuperate, escludendo il rischio di falso positivo.

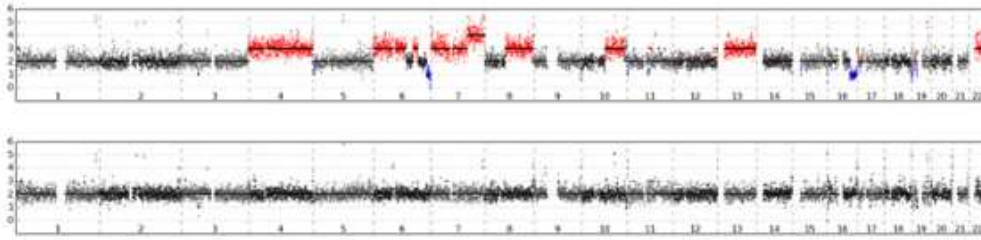


Fig.1: Esempio di analisi LowPass per il profilo dell'intero genoma (chr 1-22) su singola cellula tumorale (riquadro superiore) e cellula della linea mieloide sana (pannello inferiore). Il valore della ploidia è indicato sull'asse y, sull'asse x i diversi cromosomi. I CNV della cellula tumorale sono indicati in rosso (amplificazioni) e blu (delezioni).

Le CTC che mostreranno un profilo alterato verranno sottoposte ad analisi mutazionale per un pannello di regioni hot spot (fortemente correlate al tumore), specifico per prodotti di WGA da kit Ampli1 (Ampli1 OncoSeeK Panel).

CHIP v2 hotspot					CNV	
ABL1	EGFR	GNAQ	KRAS	PTPN11	FGFR1	ERBB2
AKT1	ERBB2	GNAS	MET	RB1	FGFR2	MET
ALK	ERBB4	HNF1A	MLH1	RET	FGFR3	
APC	EZH2	HRAS	MPL	SMAD4	EGFR	
ATM	FBXW7	IDH1	NOTCH1	SMARCB1	ALK	
BRAF	FGFR1	IDH2	NPM1	SMO	AR	
CDH1	FGFR2	JAK2	NRAS	SCR	MYC	
CDKN2A	FGFR3	JAK3	PDGFRA	STK11	CCND	
CSF1R	FLT3	KDR	PIK3CA	TP53	PTEN	
CTNNB1	GNA11	KIT	PTEN	VHL	PIK3CA	

Fig.2: Pannello Ampli 1 OncoSeq Panel per analisi NGS di campioni amplificati con Ampli1

- Sequenziamento in NGS del DNA da tessuto primitivo FFPE e ctDNA, per le regioni codificanti (esoni) di un pannello di 19 geni selezionati dopo una attenta analisi bibliografica sul tumore della mammella, in particolare TNBC. I geni presi in considerazione sono correlati direttamente a meccanismi coinvolti nello sviluppo del tumore e nella de-regolazione della crescita cellulare. Inoltre, la scelta si è basata anche sulla presenza di questi nel pannello specifico per le CTC.

AKT1	CDH1	ESR1	NOTCH1	RB1
AR	CDKN2A	GATA3	PALB2	SMAD4
BRCA1	EGFR	MLL3	PIK3CA	TP53
BRCA2	EPCAM	MLH1	PTEN	

Fig.3: I geni selezionati per il pannello di analisi NGS da applicare al materiale genetico estratto da FFPE e plasma (ctDNA)

3. Processazione ed analisi bioinformatica dei dati ottenuti in NGS
4. Analisi integrata del dato per la valutazione dello studio di fattibilità sulla Liquid Biopsy, attraverso un confronto dei dati ottenuti dalle tre diverse sorgenti. Inoltre verrà valutata l'identificazione di nuove mutazioni interessanti con potenziale valore diagnostico, prognostico o di correlazione con l'aggressività del tumore, o che possano rappresentare nuovi o già noti bersagli molecolari per terapie target.

Al termine dello studio di fattibilità, sulla base dei risultati ottenuti si deciderà se proseguire l'indagine ampliando la casistica analizzata.