

RELAZIONE SCIENTIFICA PRELIMINARE

Progetto di ricerca: Cellule tumorali circolanti e malattia minima residua nel carcinoma della mammella triplo negativo

Responsabile del progetto di ricerca: Dott.ssa Cristina Raimondi

Supervisore del progetto di ricerca: Prof.ssa Paola Gazzaniga

Con l'obiettivo di verificare l'ipotesi per cui le cellule tumorali circolanti (CTC) sfuggirebbero all'isolamento tramite CellSearch®, unico sistema di isolamento delle CTC approvato dall'FDA per uso clinico, a causa della ridotta espressione di antigeni epiteliali, è stato testato l'uso di una metodica alternativa per isolare cellule con fenotipo mesenchimale/staminale, potenzialmente responsabili della frequente recidiva precoce di malattia nelle pazienti con carcinoma mammario triplo negativo.

Risultati ottenuti:

Per la procedura di isolamento delle CTC è stato utilizzato il kit AdnaTest Breast Cancer (AdnaGen AG, Langenhagen, Germany), che consente l'arricchimento immunomagnetico delle CTC attraverso il legame con antigeni tumore associati ed epiteliali (MUC-1 e GA733-2). Una volta isolate le cellule marcate grazie ad un concentratore di particelle magnetico, è stato estratto mRNA utilizzando il Dynabeads mRNA DIRECT™ Micro Kit (DynaL Biotech GmbH, Hamburg, Germany), e sintetizzato cDNA successivamente sottoposto a multiplex RT-PCR per HER2, MUC-1 e GA733-2. Il test di isolamento delle CTC è stato considerato positivo in caso di espressione di almeno uno dei tre marcatori utilizzati. È stato valutato un gruppo di 30 pazienti affette da carcinoma mammario triplo negativo. Un solo campione è stato considerato inadeguato per

manca di espressione del controllo interno. Nei restanti 29 campioni, l'analisi per la presenza di cellule tumorali circolanti è risultata positiva nel 45% dei casi (13/29 pazienti).

Dall'analisi combinata dei risultati ottenuti nei tre centri coinvolti nella sperimentazione è emerso che la metodica testata non ha mostrato di migliorare significativamente la resa del sistema CellSearch[®], considerato al momento attuale come standard per l'isolamento delle CTC e che, nei diversi sottotipi di carcinoma mammario, consente di identificare la presenza di CTC in circa la metà dei campioni analizzati. Con l'obiettivo di perfezionare la metodica oggetto di studio, è pertanto stato stabilito, anche in accordo con la ditta produttrice, di procedere verso una sostanziale modifica della metodica stessa mediante aggiunta di nuovi marcatori molecolari (c-Met, EGFR, HER3, ER, AR, Aurora kinase, CD133), tuttora in via di elaborazione.

La necessità di muovere verso metodi di isolamento delle CTC indipendenti dalla espressione di marcatori epiteliali ha fornito il rationale per testare un sistema innovativo (ScreenCell[®]), basato sulla filtrazione per dimensioni delle cellule tumorali circolanti, da poco offerto al nostro laboratorio nell'ambito di una nuova collaborazione scientifica. Su 5 pazienti affette da carcinoma triplo negativo complessivamente studiate, l'analisi ha dimostrato presenza di CTC in 4/5 campioni, parallelamente risultati negativi con sistema CellSearch[®].

L'analisi molecolare (RT-PCR) sulle CTC isolate, ha evidenziato presenza di marcatori mesenchimali (vimentina), staminali (ALDH1, CD44^{high}/CD24^{low}) e l'espressione di una isoforma di EpCAM alternativa all'isoforma classica, utilizzata dal sistema CellSearch[®] per l'arricchimento di CTC da sangue periferico.

Sulla stessa serie di campioni, è attualmente in corso la valutazione di marcatori legati al sistema di riparazione del danno al DNA e di risposta alla terapia a bersaglio molecolare. Si procederà di qui in avanti con l'ampliamento della casistica e con la definizione di un pannello di marcatori molecolari clinicamente rilevanti per la caratterizzazione di CTC isolate tramite sistema ScreenCell[®].