

# **CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI E MALATTIA MINIMA RESIDUA NEL CARCINOMA DELLA MAMMELLA TRIPLO NEGATIVO**

Proponente: dott.ssa Cristina Raimondi

Supervisore. Prof. Paola Gazzaniga

## **Introduzione:**

Il carcinoma mammario triplo negativo (triple negative breast cancer, TNBC), caratterizzato dall'assenza di recettori ormonali e dalla mancata espressione/amplificazione di HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2), ha guadagnato negli ultimi anni notevole attenzione, a causa del suo comportamento biologico aggressivo e della mancanza di strategie terapeutiche mirate. Le pazienti affette da TNBC hanno infatti un rischio maggiore di recidiva precoce e una prognosi sfavorevole rispetto a pazienti con altri sottotipi di carcinoma mammario. Nelle neoplasie solide, cellule tumorali disseminate dal tumore primitivo in fasi precoci della progressione tumorale e resistenti alle terapie rappresentano la malattia minima residua (minimal residual disease, MRD), la cui presenza non è identificabile attraverso tecniche di imaging né di analisi istopatologiche. Analisi molecolari altamente sensibili consentono di identificare singole cellule tumorali nel sangue periferico (circulating tumor cells, CTC) di pazienti con neoplasie solide, anche nelle fasi precoci della progressione tumorale. Il concetto di CTC come marcatore di malattia microscopica ha aperto un nuovo scenario sulla possibilità di identificare cellule in transito dal tumore primitivo nella rete vascolare prima dell'evidenza di metastasi a distanza, consentendo anche l'individuazione di bersagli terapeutici non identificabili nel tumore primitivo. La ricerca delle CTC assume perciò una considerevole rilevanza clinica soprattutto in patologie come il TNBC la cui prognosi è ancora condizionata da frequenti fallimenti terapeutici e riprese precoci di malattia

Nel 2004 uno studio condotto da Cristofanilli et al. ha dimostrato per la prima volta che il numero delle CTC nel sangue periferico di pazienti con carcinoma mammario metastatico rappresenta un fattore prognostico indipendente in termini di sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale. Già dallo studio pilota di Cristofanilli è risultato evidente che nel 30-35% delle pazienti il sistema CellSearch<sup>®</sup>, unica metodica approvata dall'FDA per la conta delle CTC, non è in grado di individuare cellule tumorali circolanti.

E' opinione condivisa che l'arricchimento e selezione delle CTC attraverso EpCAM e citocheratine rappresentino il limite principale delle metodiche attualmente disponibili, consentendo l'isolamento delle sole cellule che esprimono antigeni epiteliali. Sebbene classicamente considerato a buona prognosi, il gruppo di pazienti in cui il CellSearch<sup>®</sup> non identifica CTC è di fatto eterogeneo. In un lavoro pubblicato nel 2011 da Mego et al è emerso che l'assenza di CTC accomuna pazienti con prognosi significativamente differente, di cui fanno parte pazienti in cui le cellule tumorali circolanti sono realmente assenti e pazienti in cui il sistema CellSearch<sup>®</sup> non è in grado di individuarle. L'ipotesi avanzata dagli autori è che l'analisi CellSearch<sup>®</sup> sottostimi il numero reale di CTC. Il risultato "falso negativo" sarebbe tanto più probabile nella popolazione di pazienti con malattia più aggressiva (triplo-negativo, HER2-positivo), in cui l'espressione eterogenea di marcatori epiteliali e mesenchimali indica livelli diversi di differenziazione lungo il programma di transizione epitelio-mesenchima (epithelial-mesenchymal transitino, EMT).

Con l'obiettivo di verificare l'ipotesi per cui le CTC sfuggirebbero all'isolamento tramite CellSearch<sup>®</sup> a causa della ridotta espressione di antigeni epiteliali, è stato testato l'uso di una metodica alternativa non EpCAM-dipendente per isolare cellule con fenotipo mesenchimale/staminale, potenzialmente responsabili della frequente recidiva precoce di malattia nelle pazienti con TNBC. La caratterizzazione molecolare di cellule in transito dal tumore primitivo nella rete vascolare prima dell'evidenza di metastasi a distanza potrebbe consentire anche l'individuazione di target terapeutici non identificabili nel tumore primitivo, come dimostrato dai

numerosi studi sulla variabilità biologica tra tumore primitivo e CTC. Il TNBC, in particolare, rappresenta il modello ideale per la caratterizzazione delle CTC e l'individuazione di vie di segnale come bersaglio di nuove strategie terapeutiche.

### **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. Allo scopo di analizzare marcatori di EMT nelle CTC isolate, è stato utilizzato il test AdnaTest TumorStemCell/EMT2, che consente di effettuare una multiplex PCR per i seguenti geni: Akt-2, ALDH-1, TWIST 1, PI3K $\alpha$  e actina, quest'ultima come gene housekeeping. È stato valutato un gruppo di 7 pazienti affette da carcinoma mammario triplo negativo. Per ogni paziente sono stati eseguiti due prelievi di sangue periferico per la ricerca di cellule tumorali circolanti tramite sistema CellSearch e AdnaTest Breast Cancer. Concordezza tra i due test è stata dimostrata in 4 pazienti (2 pazienti per presenza di CTC e 2 pazienti per assenza di CTC). Discordezza tra i due test è stata dimostrata in 3 pazienti, in cui soltanto AdnaTest Breast Cancer ha identificato la presenza di CTC, positive per espressione di HER2 in 2 campioni e di ALDH1 in 1 campione (Fig.1). Degno di nota è il fatto che, nell'ambito di una collaborazione precedentemente instaurata con l'UOC di Immunologia e Diagnostica Molecolare Oncologica dell'Istituto Oncologico Veneto di Padova, l'analisi con il sistema CellSearch è stata estesa alla ricerca dell'antigene CD44v6. L'anticorpo specifico per CD44v6 è stato utilizzato per migliorare la sensibilità dell'analisi CellSearch attraverso l'uso di un marcatore non epiteliale inserito nel quarto canale del sistema. La sensibilità e specificità della metodica sono state valutate sulla linea cellulare

di carcinoma mammario triplo negativo MDA MB 300 (Fig. 2). La glicoproteina CD44v6, isoforma della molecola di adesione CD44, sembra capace di contribuire alla preparazione della nicchia premetastatica, attraverso l'assemblaggio di una matrice tumorale ricca di proteasi, promuovendo la motilità delle cellule tumorali e inducendo resistenza alla morte per apoptosi. In un caso dei 7 valutati è stata identificata la presenza di cellule positive per l'espressione di CD44v6. Dati recenti di letteratura mostrano che l'attivazione della via di segnale di c-met, in cui CD44v6 gioca un ruolo cruciale, controlla la proliferazione delle cellule di carcinoma mammario, suggerendo gli inibitori di c-met come nuova promettente strategia terapeutica.

**Proposta per il secondo anno:** La complessità biologica del carcinoma mammario triplo negativo e la recente identificazione di sottotipi di TNBC diversi per profilo di espressione genica e dipendenti da vie di segnale distinte suggeriscono la necessità di algoritmi terapeutici differenziati e guidati dalla caratterizzazione molecolare della malattia. Circa il 70% dei carcinomi mammari in pazienti con mutazioni di BRCA1 sono triplo negativi e, più in generale, i carcinomi mammari triplo negativi BRCA1-associati e sporadici condividono molti aspetti istopatologici (scarso grado di differenziazione e stesso pattern di espressione di citocheratine) e profili di espressione genica riconducibili al sottotipo molecolare basal-like. Su queste basi, sembra plausibile supporre che, come in presenza di mutazioni di BRCA1, almeno in un sottogruppo di carcinomi sporadici triplo negativi difetti nei meccanismi di riparazione del danno al DNA giustifichino l'uso di chemioterapie a base di sali di platino. Dati recenti di letteratura mostrano, d'altra parte, una considerevole eterogeneità tra carcinoma mammari sporadici triplo negativi nella risposta alla chemioterapia con cisplatino, rendendo più che mai necessaria l'identificazione di biomarcatori predittivi di risposta alla terapia. La proteina ERCC1 gioca un ruolo chiave nei meccanismi di resistenza al platino e recenti evidenze mostrano la sua espressione in circa due terzi dei casi di carcinoma mammario triplo negativo.

Con l'obiettivo di isolare e caratterizzare per biomarcatori predittivi di risposta alla terapia le CTC in pazienti affette da TNBC, si intende studiare su una popolazione omogenea di pazienti con carcinoma mammario triplo negativo localmente avanzato l'espressione di un pannello di marcatori di resistenza alla terapia (ERCC-1, Ki-67, c-met) prima e dopo chemioterapia neoadiuvante.

Obiettivo primario dello studio è di stabilire se esiste una correlazione tra espressione di marcatori di resistenza alla terapia su CTC e risposta clinico-patologica alla chemioterapia neoadiuvante in una popolazione di pazienti affette da TNBC trattate con combinazioni a base di platino e taxani.

Nelle pazienti con malattia residua dopo chemioterapia neoadiuvante, obiettivo secondario dello studio è di stabilire se esista una corrispondenza con la persistenza di CTC e di caratterizzare il profilo molecolare delle eventuali cellule ancora presenti in circolo.

#### **References:**

1. Carey LA et al The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007;13(8):2329-34
2. Cristofanilli M. The "microscopic" revolution in breast carcinoma. *Cancer.* 2005;103(5):877-80.
3. Gorges TM et al Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2013;62(5):931-9
4. Hüsemann Y, et al Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 2008;13:58-68
5. Isakoff SJ. Triple-negative breast cancer: role of specific chemotherapy agents. *Cancer J.* 2010;16(1):53-61.
6. Lehmann BD, et al Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2750-67
7. Martin LP et al Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res.* 2008;14(5):1291-5

8. Metzger-Filho O, et al. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(15):1879-87
9. Mego M, et al Characterization of metastatic breast cancer patients with nondetectable circulating tumor cells. *Int J Cancer*. 2011;129(2):417-23
10. Miller MC, et al Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol*. 2010;2010:617421.
11. Müller V, Alix-Panabières C, Pantel K. Insights into minimal residual disease in cancer patients: implications for anti-cancer therapies. *Eur J Cancer*. 2010;46(7):1189-97
12. Ozkan C et al ERCC1 expression in triple negative breast cancer. *J BUON*. 2012;17(2):271-6
13. Perou, CM, et al Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
14. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*. 2010;15 Suppl 5:39-48.
15. Prat A, et al Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011;5(1):5-23.
16. Prat A, et al Molecular characterization of Basal-like and non-Basal-like triple-negative breast cancer *Oncologist*. 2013;18(2):123-33
17. Rack B et al CTCs in primary breast cancer (I) Recent Results Cancer Res. 2012;195:179-85
18. Sorlie, T, et al Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-74.
19. Sousa B et al Neoadjuvant treatment for HER-2-positive and triple-negative breast cancers. *Ann Oncol*. 2012;23 Suppl 10:x237-42
20. Strati A, et al Comparison of three molecular assays for the detection and molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2013;15(2):R20.
21. von Minckwitz G et al Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2012;30(15):1796-804
22. Wicha MS, Hayes DF. Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected. *J Clin Oncol*. 2011;29(12):1508-1