

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*.

Background:

Il tumore alla mammella è uno dei più comuni tumori che annualmente colpisce più del 20% delle donne in tutto il mondo. Nonostante il progresso 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 e i marcatori istopatologici, come il recettore per l'estrogeno, quello per il progesterone, il recettore per il fattore di crescita epidermico umano (HER2) e il Ki-67, sebbene fondamentali per la definizione della prognosi e per la scelta delle strategie terapeutiche, non riflettono ancora del tutto la complessità di tale patologia.

Il carcinoma mammario triplo negativo (TNBC) è caratterizzato dalla mancata espressione dei recettori per gli estrogeni e il progesterone e dall'assenza di amplificazione di HER2. Clinicamente, questo sottotipo di tumore alla mammella si presenta come scarsamente differenziato, di grandi dimensioni, con possibile coinvolgimento linfonodale alla diagnosi. Le donne che ne sono affette, presentano un rischio maggiore di recidiva precoce (da uno a tre anni dalla diagnosi) ed una prognosi più sfavorevole rispetto agli altri sottotipi. Il trattamento terapeutico ad oggi utilizzato per le pazienti affette da TNBC prevede l'asportazione chirurgica del tumore, la radioterapia e la terapia per via sistemica con chemioterapici convenzionali a causa della mancanza di target terapeutici specifici. Nelle pazienti non responsive alla chemioterapia, il periodo di remissione è relativamente breve e la ricaduta/progressione è prevista in un breve periodo di tempo. 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 per gli interventi terapeutici.

Le cellule tumorali circolanti (CTC) sono cellule che si distaccano dalla massa tumorale primaria per riversarsi nel sangue periferico costituendo così il principale veicolo per la disseminazione della malattia. Fino ad ora, le CTC sono state principalmente studiate nel tumore alla mammella metastatico. Ci sono evidenze secondo le quali queste cellule giocano un ruolo prognostico e siano capaci di dare una previsione della risposta alla terapia. Sono state effettuate analisi anche su tumori mammari in stadio precoce. È stato osservato come la presenza di una o più CTC in 7,5 mL di sangue periferico corrisponda ad una prognosi più sfavorevole. A seguito di una recente meta-analisi su entrambi i tipi di carcinoma mammario (precoce e metastatico), le CTC sono state associate ad un aumentato rischio di recidiva della malattia indipendentemente dal metodo di rilevazione o punto di tempo di prelievo di sangue. L'analisi delle CTC e del loro profilo molecolare potrebbe risultare quindi molto importante per la comprensione dei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo e dei fenomeni di ricaduta e disseminazione del tumore e per l'identificazione di nuovi target terapeutici.

La presenza di DNA libero circolante (*cell free DNA*, cfDNA) all'interno del 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. Studi approfonditi sulla presenza di cfDNA in pazienti affetti da tumore, tra cui anche il carcinoma della mammella, hanno dimostrato come i livelli di DNA tumorale circolante (ctDNA) fossero più alti nei pazienti malati rispetto ai livelli di cfDNA in soggetti affetti da patologie benigne. Sono in corso studi per definire come l'aumento di ctDNA nel plasma possa essere indicativo di una risposta alla terapia, in quanto i trattamenti inducono morte cellulare che provoca una perdita di DNA nel sangue. Sul 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 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.

Recentemente, le tecniche di *Next Generation Sequencing* (NGS) hanno acquisito notevole rilevanza nel campo della ricerca e diagnostica oncologica grazie alla possibilità di analizzare un numero elevato di variazioni genetiche alla base dello sviluppo, della progressione e dell’aggressività dei tumori, in tempi relativamente brevi e con sensibilità e specificità.

Obiettivi dello studio

1. Comparare i profili molecolari delle CTC e del tessuto tumorale primitivo di 12 pazienti con tumore alla mammella. Confermare, mediante Real-time PCR, su plasma delle medesime pazienti eventuali geni individuati interessanti.
2. Verificare l’eventuale presenza di una o più mutazioni/alterazioni genetiche riconducibili all’aggressività del tumore e /o predisponenti per terapie target.

Obiettivi del primo semestre

1. Presentazione e approvazione del progetto da parte del Comitato medico scientifico di AUSL Romagna
2. Scelta delle pazienti da far rientrare nello studio
3. Recupero dei campioni di FFPE, CTC e plasma.
4. Ottimizzazione del protocollo di *Next Generation Sequencing* su singola cellula e su tessuto paraffinato.

Attività di laboratorio

• **Burocrazia**

Prima di tutto abbiamo sottoposto il progetto al nostro Comitato Medico e Scientifico che, dopo gli opportuni controlli, lo ha approvato in data 13 dicembre 2016. È stata inoltre confermata la validità dell’approvazione del Comitato Etico per l’analisi del materiale raccolto dalle pazienti entrate nello studio, per il quale avevano firmato un consenso informato.

• **Scelta della casistica**

All’interno della casistica già arruolata in Istituto per un precedente studio, sono state selezionate 12 pazienti (vedi tabella 1): 6 pazienti con diagnosi di tumore mammario triplo negativo e altre 6 pazienti non affette da TNBC, scelte secondo i seguenti criteri:

- Espressione recettoriale: ER+, PgR+, Her2 –
- Presenza dei campioni di plasma e FFPE.

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.

abbreviazioni utilizzate:

ER recettore per estrogeni, PgR recettore per progesterone, MIB1 indice di proliferazione, NED *no evidence of disease*, PR *partial response*

- Raccolta e valutazione dei campioni**

Una volta selezionate le 12 pazienti, si è proceduto con il recupero dei campioni stoccati.

Per i tessuti tumorali inclusi in paraffina, è stato necessario richiedere l'autorizzazione all'anatomia patologica di Forlì. È stato possibile accedere al materiale da loro conservato e raccogliere 6 sezioni di tessuto paraffinato per ciascuna paziente.

Su uno di questi vetrini è stata poi effettuata una colorazione in ematossilina/eosina per discriminare il tessuto tumorale e la parte di tessuto sano. Questa discriminazione è stata svolta con l'aiuto del Patologo di riferimento dell'Istituto.

La colorazione in ematossilina ed eosina (H&E) è considerata il *gold standard* per la colorazione in analisi istopatologica. È comunemente usato in istologia e negli esami istopatologici di routine, poiché rende evidenti particolari strutture come nuclei e citoplasma, con un conseguente aumento del contrasto degli oggetti di interesse nelle immagini del campione. L'ematossilina è un colorante basico che si lega a molecole acide conferendo a esse un colore blu violaceo: nuclei, ribosomi e reticolo endoplasmatico rugoso hanno quindi una forte affinità per questo colorante a causa del loro elevato contenuto in DNA e RNA, rispettivamente. L'eosina è invece una molecola acida che colora le strutture basiche (acidofile) in rosso/rosa. La maggior parte delle proteine citoplasmatiche è di tipo basico, e quindi il citoplasma, a contatto con eosina, si colora di rosa o rosso chiaro e diviene facilmente distinguibile. In generale quindi, i tessuti colorati con H&E sono caratterizzati da un buon contrasto e le cellule hanno i nuclei di colore blu e il citoplasma di colore rosa o rosso.

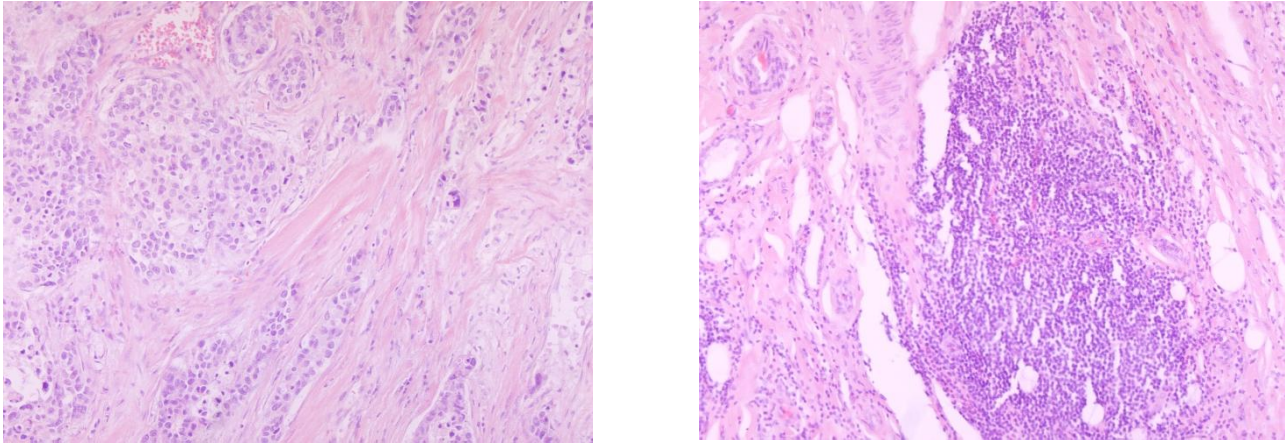


Fig.1 Vetrini di FFPE colorati in Ematossilina/eosina

È stata svolta questa colorazione e valutazione, poiché, per avere il massimo della resa ed efficienza del test, è necessario avere il tessuto tumorale senza contaminazioni da parte di quello sano.

Per quanto riguarda invece le cellule tumorali circolanti (CTC) si è proceduto con la rivalutazione della positività o negatività delle CTC recuperate mediante l'uso del DEPArray®. Questo strumento ci ha permesso di recuperare in provette le singole cellule considerate, ad una prima analisi, CTC. Il DEPArray® permette di discriminare una cellula tumorale da una cellula del sangue grazie alla diversa colorazione che queste acquisiscono dopo l'opportuna processazione del campione di sangue e colorazione con diversi anticorpi. Nella figura 2 possiamo vedere la tipica immagine che ci propone lo strumento: in blu, DAPI, è stato colorato il nucleo cellulare; in giallo (EpCAM-PE) sono colorate le cellule tumorali e in rosso (CD45-APC) i leucociti.

	Group	dapi_0	dapi_pe_a pc_1	pe_2	apc_3	dapi_pe_4	dapi_apc_5	dapi_pe_a pc_6	dapi_brig htfield_7	mean_int ensity_pe	mean_int ensity_ap c
cell_id = 12993 row_num = 1	CTC_L									769.89	1128.82
cell_id = 289 row_num = 2	CTC_L									958.07	1387.36

Fig. 2_ immagine delle cellule al DEPArray®. In blu (DAPI) è colorato il nucleo delle cellule, in rosso (CD45-APC) i globuli bianchi e il giallo (EpCAM-PE) le cellule tumorali circolanti. Queste due immagini mostrano come siano presenti una cellula tumorale (in giallo) legata ad un globulo bianco (in rosso) e come siano distinguibili le due cellule.

Abbiamo cominciato a svolgere prove di amplificazione del materiale genetico di singole cellule provenienti da linee cellulari stabilizzate selezionate mediante DEPArray®. Queste prove ci hanno permesso di ottimizzare al meglio il protocollo di *Whole Genome Amplification* e di *Quality Control* del DNA delle singole cellule.

Obiettivi del secondo semestre

1. Applicare il protocollo ottimizzato di *Whole Genome Amplification* all'intera casistica di CTC e di tessuto paraffinato.
2. Procedere con il sequenziamento mediante *Next Generation Sequencing* su piattaforma IonTorrent.
3. Comparazione dei 12 profili molecolare ed individuazione di eventuali mutazioni interessanti.