

Bando di ricerca sanitaria LILT 2017

Proponente: LILT – Parma

Responsabile Scientifico: Dott. Antonino Musolino, Breast Unit interaziendale della provincia di Parma, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma e Azienda Unità Sanitaria Locale di Parma

Titolo: Studio pilota di "Nutriepigenomica" come prevenzione primaria del tumore della mammella e dell'ovaio in donne a elevato rischio eredo-familiare e mutazione germinale dei geni BRCA1 e BRCA2.

Premesse e Razionale ("Background"):

Il carcinoma mammario ereditario rappresenta circa il 5-10% di tutti i casi di tumore della mammella ed è associato ad una aumentata incidenza di carcinoma ovarico. Questa sindrome genetica è causata, in circa il 50% dei casi, da una mutazione germinale dei geni BRCA1 e BRCA2 [1]. I geni BRCA1 e BRCA2 sono importanti geni oncosoppressori implicati nel meccanismo di riparazione del DNA. Alcune donne, che ereditano sin dalla nascita la forma mutata di uno di questi geni (mutazione germinale), sono predisposte a sviluppare, nel corso della loro vita, un tumore della mammella nel 55-60% dei casi ed un tumore dell'ovaio nel 16-59% [1]. In questi casi, le strategie preventive proponibili sono i controlli radiologici intensivi (prevenzione secondaria) o la chirurgia profilattica di mammelle e ovaio (prevenzione primaria).

Sebbene il rischio di carcinoma mammario e ovarico aumenti considerevolmente, non tutte le donne portatrici delle mutazioni di BRCA1 e BRCA2 sviluppano una neoplasia. La differente espressione del potenziale cancerogeno dei due geni si definisce "penetranza". Esiste pertanto una elevata variabilità interpersonale nelle modalità e nei tempi di insorgenza dell'evento tumorale in questi soggetti, suggerendo un potenziale ruolo di altri fattori di rischio individuali, sia endogeni che esogeni, nel modulare la penetranza delle mutazioni germinali dei geni BRCA1 e BRCA2. E' interessante notare come l'incidenza di carcinoma mammario e ovarico nelle donne BRCA mutate sia maggiore nelle portatrici nate dopo il 1940, suggerendo il ruolo svolto dalla modificazione dello stile di vita nell'espressione del potenziale cancerogeno di questi geni [2]. Dati di letteratura evidenziano come la pratica costante dell'esercizio fisico ed una dieta sana ed equilibrata possano ridurre il rischio di carcinoma mammario nei soggetti portatori di mutazione BRCA [2]. La branca della medicina che studia i meccanismi di regolazione genica del DNA da parte di fattori esogeni è denominata "Epigenomica".

I microRNA (miRNA) sono micro frammenti di RNA coinvolti nella modificazione post-trascrizionale, epigenetica, dell'espressione del DNA. Diversi studi indicano come alcuni miRNA siano correlati con: i) un aumentato rischio di tumore della mammella e dell'ovaio; ii) alcuni stili di vita o fattori di rischio individuali modificabili o voluttuari; iii) la presenza di mutazioni nei geni BRCA. I miRNA *miR-21*, *miR-125b*, *miR-451*, *miR-484* e *miR-155* sono associati ad un aumentato rischio di insorgenza di carcinoma mammario e ovarico [3]. Inoltre, alcuni di essi, come *miR-155*, sono maggiormente espressi in donne portatrici di mutazioni dei geni BRCA1 e BRCA2 [3,4].

Alcuni pannelli genici, che valutano contemporaneamente numerosi miRNA, sono in grado di individuare profili di espressione miRNA differenti tra donne sane, donne affette da carcinoma della mammella sporadico e donne affette da carcinoma mammario BRCA-mutato [5]. I miRNA sono facilmente reperibili da campioni di sangue, saliva o urine, rendendo maneggevole la loro analisi seriata e ripetuta nel tempo [5].

La nutriepigenomica è una nuova area di investigazione che mira ad evidenziare il ruolo della alimentazione nel modificare variazioni epigenetiche (indotte e inducibili) causa di rischio tumorale. Recenti studi hanno dimostrato come l'espressione dei miRNA può essere influenzata dall'alimentazione. Alcuni alimenti facilmente introducibili nella dieta, come ad es. la curcumina contenuta nel curry o l'epigallocatechin-3-gallateil (EGCG) contenuto nel té verde, possono ridurre

la presenza di miRNA oncogenici e favorire l'incremento di miRNA oncosoppressori [6]. Un adeguato apporto di nutrienti, vitamine e antiossidanti con una dieta ricca di frutta e verdura incrementa la concentrazione di miRNA oncosoppressori [7].

Ipotesi scientifica alla base del progetto:

Una strategia nutrizionale può regolare l'espressione di variabili epigenetiche (miRNA) associate allo sviluppo tumorale e in tal modo modulare la penetranza (rischio) e le manifestazioni fenotipiche (età di insorgenza e tipologia dell'evento tumorale) delle mutazioni germinali dei geni BRCA1 e BRCA2.

Obiettivi:

Obiettivo Primario: Valutare come un programma nutrizionale possa modulare i profili di rischio epigenetico individuale in una coorte di donne giovani, non affette, portatrici di mutazioni germinali a carico dei geni BRCA1 e BRCA2.

Obiettivi secondari: a) Valutare la variazione di fattori di rischio individuali e comportamentali durante il programma nutrizionale; b) Valutare gli esiti riportati dalle pazienti (patient-reported outcome, PRO) su beneficio e risultati ottenuti mediante l'intervento nutrizionale; c) Valutare il rischio tumorale in relazione ai profili epigenetici individuati al baseline e al termine del programma nutrizionale.

Materiali e metodi:

Disegno: Studio prospettico a carattere interventistico non farmacologico.

Popolazione in Studio: Donne giovani, non affette, portatrici di mutazioni germinali a carico dei geni BRCA1 e BRCA2 sottoposte al programma assistenziale per il rischio ereditario del tumore della mammella e/o ovaio della Regione Emilia-Romagna [8].

Criteri di inclusione:

- Evidenza mutazione germinale dei geni BRCA1 e/o BRCA2
- Età 18 – 40 anni
- Partecipazione al programma assistenziale per il rischio ereditario del tumore della mammella e/o ovaio della Regione Emilia-Romagna
- Performance status (Eastern Cooperative Oncology Group) ≤ 1
- Normale funzione di organo e midollare.
- Consenso informato scritto.

Criteri di esclusione:

- Precedente diagnosi di tumore della mammella e/o dell'ovaio
- Precedenti intervento di mastectomia e/o ovariectomia profilattica
- Condizioni cliniche in fase attiva o non controllate che limiterebbero la conformità ai requisiti dello studio.
- Gravidanza o allattamento

Attività svolte durante lo studio (Intervento sperimentale):

– Visita individuale di inizio studio:

- Raccolta anamnesi (familiare, fisiologica, patologica, farmacologica, ginecologica e mestruale)
- Valutazione stile di vita e abitudini voluttuarie (alcol, fumo, ecc.)
- Misurazione peso, altezza, body mass index (BMI), parametri vitali (temperatura, frequenza cardiaca, pressione arteriosa, frequenza respiratoria).
- Valutazione attività fisica e stato nutrizionale attraverso l'*International Physical Activity Questionnaire* (IPAQ) [9]
- Esami ematochimici di baseline (routine ematochimica, colesterolo totale, trigliceridi, colesterolo-LDL, glicemia a digiuno).
- Calcolo insulino-resistenza (HOMA index)

- Prelievo di campione di sangue e saliva per miRNA
- Compilazione questionario di qualità di vita (HRQOL) attraverso la Short Form (36) Health Survey (SF-36) [10]
- Consulenza nutrizionale e consegna del programma nutrizionale personalizzato.
- Interviste telefoniche a cadenza mensile (1 volta al mese):
 - Raccolta esiti riportati dalle pazienti (PRO) attraverso questionari standardizzati [11]
 - Valutazione aderenza al programma nutrizionale
- Eventi educazionali e formativi di gruppo su nutrizione e stili di vita a cadenza bimestrale (ogni 2 mesi).
- Visite periodiche individuali a cadenza trimestrale (ogni 3 mesi):
 - Raccolta anamnesi (familiare, fisiologica, patologica, farmacologica, ginecologica e mestruale)
 - Valutazione stile di vita e abitudini voluttuarie (alcol, fumo, ecc.)
 - Misurazione peso, altezza, body mass index (BMI), parametri vitali (temperatura, frequenza cardiaca, pressione arteriosa, frequenza respiratoria).
 - Valutazione attività fisica e stato nutrizionale attraverso l'*International Physical Activity Questionnaire* (IPAQ) [9]
 - Esami ematochimici di baseline (routine ematochimica, colesterolo totale, trigliceridi, colesterolo-LDL, glicemia a digiuno).
 - Calcolo insulino-resistenza (HOMA index)
 - Prelievo di campione di sangue e saliva per miRNA (a 6, 12, 18 e 24 mesi)
 - Compilazione questionario di qualità di vita (HRQOL) attraverso la Short Form (36) Health Survey (SF-36) [10]
 - Consulenza nutrizionale e aggiornamento del programma nutrizionale personalizzato.

Analisi di laboratorio (miRNA):

Verranno effettuati su ciascuna partecipante allo studio prelievi di sangue e saliva al **baseline** e nei punti temporali: **6, 12, 18 e 24 mesi**. Saranno utilizzate le più recenti piattaforme di pannelli genici per eseguire l'analisi "genome-wide" di espressione dei miRNA [3-6]. L'RNA totale verrà estratto utilizzando specifici kit di isolamento e la quantità e la qualità del RNA saranno valutate spettrofotometricamente [3-5]. La determinazione dei livelli sierici dei miRNA di interesse verrà eseguita mediante droplet digital PCR (ddPCR) [3-5].

Modalità di misurazione dei risultati (Endpoints):

Endpoint primario: Profilo epigenetico dei microRNA (miRNA) correlati allo stato mutazionale BRCA e al rischio di insorgenza del tumore della mammella e dell'ovaio.

Endpoint secondari: HRQOL; PRO; IPAQ; tasso di aderenza al programma nutrizionale; BMI; event-free survival (EFS) generale e in relazione ai profili epigenetici al baseline e al termine del programma nutrizionale.

Analisi statistica:

Lo studio vuole verificare l'ipotesi nulla (H_0) che l'effetto del programma nutrizionale di ridurre la frequenza nella popolazione in studio dei profili epigenetici (miRNA) a rischio per tumore della mammella/ovaio sia al massimo 0.1 contro l'ipotesi alternativa (H_1) che sia 0.30. L'elevato numero di miRNA valutati richiederà l'utilizzo di una procedura statistica in grado di aumentare l'efficienza anche con un numero limitato di campioni. Per questo motivo sarà utilizzata la "Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis" (sPLS-DA) [12]. Verrà inoltre utilizzata l'analisi della varianza (ANOVA) per confrontare i valori medi tra gruppi di pazienti. Sulla base del disegno a singolo stadio di Fleming [13], per verificare l'ipotesi in studio, sarà necessario arruolare 25 soggetti per avere un potere del 80% con un errore $\alpha = 0.05$. Il programma nutrizionale sarà considerato

promettente se ci saranno almeno 6 risposte nei 25 soggetti previsti. La distribuzione binomiale degli intervalli di confidenza (CI) per stimare l'effetto reale del trattamento nutrizionale sarà costruita secondo il metodo di Duffy e Santner [14]. La distribuzione della EFS sarà stimata secondo il metodo di Kaplan Meier [15]. I test di Fisher e del Chi-quadro [16] saranno usati per confrontare le caratteristiche clinico-molecolari dei soggetti in studio in relazione alla risposta al programma nutrizionale. Una $P < 0.05$ sarà considerata statisticamente significativa. I dati clinici e molecolari ottenuti durante lo studio saranno raccolti attraverso la compilazione di una CRF elettronica (eCRF). Le analisi statistiche in programma saranno eseguite mediante il software statistico SPSS.

Durata dello studio:

Due anni.

Bibliografia:

1. Castéra L, Krieger S, Rousselin A et al. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Eur. J. Hum. Genet.* 2014; 22(11):1305–1313.
2. Kiechle M, Engel C, Berling A et al. Lifestyle intervention in BRCA1/2 mutation carriers: study protocol for a prospective, randomized, controlled clinical feasibility trial (LIBRE-1 study). *Pilot Feasibility Stud.* 2016; 2(1):74.
3. Gasparri ML, Casorelli A, Bardhi E et al. Beyond circulating microRNA biomarkers: Urinary microRNAs in ovarian and breast cancer. *Tumor Biol.* 2017; 39(5):101042831769552.
4. Zearo S, Kim E, Zhu Y et al. MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers. *BMC Cancer* 2014; 14(1):200.
5. Murria Estal R, Palanca Suela S, De Juan Jiménez I et al. MicroRNA signatures in hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2013; 142(1):19–30.
6. Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. *Epigenomics* 2011; 3(4):503–518.
7. Abdul QA, Yu BP, Chung HY et al. Epigenetic modifications of gene expression by lifestyle and environment. *Arch. Pharm. Res.* 2017:1–19.
8. <http://salute.regione.emilia-romagna.it>
9. Kim Y, Park I, Kang M. Convergent validity of the international physical activity questionnaire (IPAQ): meta-analysis. *Public Health Nutr.* 2013 Mar;16:440-5.
10. Tenor C, Donnelly M. A methodological review of the Short Form Health Survey 36 (SF-36) and its derivatives among breast cancer survivors. *Qual Life Res.* 2015 Feb;24:339-62.
11. Eid R, Haddad FG, Kourie HR, Kattan J. Electronic patient-reported outcomes: a revolutionary strategy in cancer care. *Future Oncol.* 2017 Nov 10. [Epub ahead of print].
12. Le Cao KA, Boitard S, Besse P (2011) Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinforma* 12:253.
13. Fleming TR. One sample multiple testing procedure for phase II clinical trials. *Biometrics.* 1982;38:142–151.
14. Duffy, Diane & Santner, Thomas. (1987). Confidence Intervals for a Binomial Parameter Based on Multistage Tests. *Biometrics.* 43.
15. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-81.
16. Freeman DH. Applied categorical data analysis. New York: Marcel Dekker, Inc. 1987.

Parma, 13/11/17

AZIENDA OSPEDALIERO-UNIVERSITARIA DI PARMA
BREAST UNIT
Dott. A. MUSOLINO
C.F. MISL.NNN 75L24 H224Q