



LEGA ITALIANA PER LA LOTTA CONTRO I TUMORI

prevenire è vivere

Sezione Provinciale di Trieste Onlus

PROGETTO DI RICERCA: Valutazione del *Circulating or cell-free DNA (cfDNA)* e *cfDNA integrity (cfDI)* come potenziale bio-marcatore nella diagnosi precoce del tumore della mammella

AREA TEMATICA: Prevenzione secondaria: approcci innovativi nella diagnosi precoce dei tumori e nel miglioramento della qualità dei percorsi di diagnosi precoce.

RESPONSABILE: Prof. Daniele Generali, Dipartimento Universitario Clinico di Scienze Mediche, Chirurgiche e della Salute, Università degli Studi di Trieste

RAZIONALE:

Ogni anno in Europa sono oltre due milioni le persone che si ammalano di tumore e un milione le vittime di questa battaglia impari contro quello che è definito "il male del secolo". La prevenzione e i nuovi trattamenti limitano l'incidenza e la morte di una malattia che si abbatte principalmente su polmoni, colon e seno con un numero di casi ancora troppo alto.

Secondo l'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC), un terzo degli europei sarà colpito da questa malattia e un quarto avrà un esito infausto durante il loro ciclo di vita. Il trend purtroppo non accenna a diminuire, anzi è in netta ascesa. I tumori ai polmoni, al colon e al seno sono responsabili dei due terzi di tutti le neoplasie nell'UE, mentre il fumo è responsabile del 25% delle morti da esse provocate. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Salute, un terzo dei tumori è evitabile e la medicina oggi può curare un cancro su due.

Qualità, efficacia, efficienza sono termini tradizionalmente afferenti ai processi delle imprese di produzione di beni e servizi operanti nel sistema di mercato privato che, a prima vista, non sembrano facilmente trasferibili al settore della Pubblica Amministrazione (PA). Negli ultimi anni tuttavia, anche come reazione a situazioni di forti inefficienze gestionali e a seguito della sempre minore disponibilità di risorse economiche nel settore dei pubblici servizi si è accentuato, anche nel mondo della PA, l'interesse nei confronti di tali aspetti. Lo stesso Ministro per le Riforme e le Innovazioni nella Pubblica Amministrazione, con una Direttiva emanata nel 2006, invita le amministrazioni ad impegnarsi in percorsi di miglioramento continuo delle prestazioni adottando modelli organizzativi e gestionali orientati al "processo" e già sperimentati nel settore privato. La

“gestione per processi”, com’è noto, comporta un’analisi e una progettazione dell’organizzazione, che non si incentri sui concetti classici di attività, compiti e funzioni, gerarchicamente legati, ma che si basi su un insieme di attività omogenee dal punto di vista dell’*output* e correlate tra loro al di là dei confini funzionali.

Il primo processo vero di miglioramento con un positivo impatto socio-economico è la prevenzione secondaria e il miglior trattamento terapeutico di tipo personalizzato. L’inserimento dei programmi di screening per il tumore alla mammella e per il tumore colon-retto ha permesso, in combinazione con i nuovi farmaci, di controllare in modo positivo la mortalità per queste patologie tumorali. Ulteriori passi di miglioramento in questo ambito possono essere ancora fatti.

Il tumore al seno resta il secondo tumore più frequente nel mondo e uccide più donne di qualsiasi altro tipo di cancro. Oggi nella maggior parte dei paesi sviluppati una donna su otto si ammalerà probabilmente di tumore al seno. L’obiettivo è quindi rafforzare il sostegno all’individuazione precoce e offrire trattamenti più efficaci e personalizzati.

Dalla loro scoperta da parte di Mandel e Metais nel 1948, lo studio degli acidi nucleici circolanti ha subito una notevole evoluzione nell’ultimo decennio permettendo una loro caratterizzazione molecolare. Recentemente è stato identificato che gli acidi nucleici circolanti possono dare utili informazioni sulla malattia oncologica nel paziente: in particolare il DNA libero circolante (circulating cell free DNA, cfDNA) è utilizzato come biomarcatore tumorale. L’isolamento del cfDNA è effettuato da plasma, la sua raccolta avviene tramite un semplice prelievo venoso e quindi attraverso metodi poco invasivi e facilmente ripetibili in qualsiasi struttura sanitaria (1, 2).

Numerosi studi hanno identificato che il cfDNA plasmatico è un biomarcatore tumorale, in quanto la sua quantità aumenta in pazienti affetti da neoplasia, è caratterizzato da una lunghezza diversa rispetto al profilo di frammentazione caratteristico dei soggetti sani e può presentare le stesse modificazioni genetiche ed epigenetiche del tumore di origine (3).

In particolare, è stata dimostrata la presenza sia di mutazioni che di modificazioni epigenetiche in cfDNA derivante da sangue prelevato di pazienti affetti da tumore della vescica, della mammella, del colon, del rene, del fegato, del polmone, del pancreas, dell’endometrio e dell’ovaio (2, 4).

Il cfDNA, quindi, rappresenta un surrogato del tumore che è facilmente collezionabile con un prelievo di sangue e ripetibile nel tempo ad ogni intervallo ritenuto utile. Questo permette di prospettare un suo utilizzo per il monitoraggio nel tempo dello stato del paziente: qualora il tumore primario sia stato completamente eradicato, si assiste ad un ritorno a livelli fisiologici del cfDNA; qualora questo non sia avvenuto, l’analisi del cfDNA testimonia la permanenza. Queste caratteristiche fanno sì che il cfDNA possa rappresentare un substrato di notevole interesse nell’era della medicina personalizzata.

L’analisi delle quantità di DNA libero sierico in pazienti con tumori maligni e benigni, ha mostrato livelli marcatamente più elevati nei pazienti con neoplasie maligne, e livelli più bassi e

variabili, in alcuni casi sovrapponibili ai valori riportati per i controlli sani, nei pazienti con patologie benigne (4, 5). Queste premesse rendono quindi plausibile utilizzare il cfDNA come possibile marcatore precoce di insorgenza di patologia mammaria maligna. Inoltre, l'integrità del cfDNA ha dimostrato essere alterata nei tumori solidi, diventando così un possibile parametro di valutazione dello stato di trasformazione della cellula da preneoplastica a neoplastica e della progressione della cellula tumorale. In questo senso il cfDNA è un potenziale biomarcatore di sorveglianza dell'evoluzione della patologia tumorale e dell'efficacia del suo trattamento clinico.

SCOPO DEL PROGETTO e BACKGROUND

La crescente necessità, nell'ambito dell'epidemiologia clinica e dell'oncologia clinica, di poter disporre di marcatori efficaci e scarsamente invasivi per il monitoraggio e la stratificazione del rischio di utenti dei programmi di screening o dei pazienti con conclamata patologia neoplastica, ha portato molti gruppi di ricerca ad indagare il ruolo di nuovi marcatori molecolari, tra cui gli acidi nucleici circolanti. Le promettenti evidenze portate dalla recente letteratura relativamente ad alcune neoplasie, quali il carcinoma metastatico della mammella e della prostata, supportano la necessità di implementare le conoscenze su questi marcatori e di indagarne il ruolo nei soggetti sani verso i soggetti affetti da neoplasia. E' in questo contesto che si colloca il nostro studio, il cui scopo è quello di valutare le potenzialità della quantificazione del DNA libero plasmatico nel sangue (cfDNA) di donne sane a confronto con pazienti con neoplasie mammarie.

In particolare, la valutazione di *Circulating or cell-free DNA (cfDNA)* e *cfDNA integrity (cfDI)*, due promettenti marcatori molecolari, è stata effettuata dal nostro gruppo di ricerca su una casistica limitata di donne sane, donne con patologia mammaria benigna e donne con carcinoma della mammella metastatico, con carcinoma della mammella in stadio precoce o localmente avanzato, in momenti successivi del loro iter diagnostico-terapeutico. In breve, l'integrità del cfDNA (cfDI) e la concentrazione del cfDNA sono state analizzate misurando le sequenze ALU e LINE1 con metodica di qRT-PCR. La simultanea valutazione del cfDI e della concentrazione del cfDNA è stata in grado di differenziare i controlli (area sotto la curva, AUC = 0.75) dai casi di tumori in stadio iniziale e avanzato. La concentrazione del cfDNA ha permesso di individuare inoltre differenze significative tra casi e controlli (area sotto la curva, AUC = 0.93). Infine, in caso di malattia tumorale, il cfDNA ha dimostrato una correlazione positiva con il tempo libero da malattia (HR di 0,46 per ALU, $p = 0,0025$) e con la sopravvivenza globale (HR di 0,15 per ALU e 0.20 per LINE1, $p < 0,0001$). Pertanto, la differenza tra donne sane e donne affette da patologia maligna è risultata significativa, indicando che la riduzione del cfDI e l'aumento della concentrazione del cfDNA sono potenziali marcatori diagnostici in grado di differenziare i controlli sani dai casi a diverso stadio di malattia. Ciò rende il cfDNA e cfDI dei candidati interessanti come

biomarcatori innovativi per un'analisi di screening preventivo e non invasivo di tipo ematologico, finalizzabile anche al monitoraggio delle donne giovani che non beneficiano degli attuali programmi di screening per la mammella. Inoltre il cfDNA e il cfDI sono candidati come biomarcatori di notevole valore clinico per seguire l'evoluzione della malattia e la risposta ai trattamenti terapeutici.

RISULTATI ATTESI:

Il risultato atteso è quello di individuare un biomarcatore robusto, ripetibile e di facile valutazione, predittivo di diagnosi precoce e di evoluzione per tumore della mammella con metodiche non invasive, utile anche alla terapia personalizzata.

L'esecuzione di un prelievo di sangue è una procedura semplice e con pochi rischi per utenti e/o pazienti. Oggi esistono strumentazioni e kit dedicati all'estrazione automatica da sangue di cfDNA che rendono pertanto la raccolta di DNA di potenziale origine tumorale semplice, rapida, efficiente e sufficientemente adeguata per la successiva analisi. I laboratori di analisi ospedalieri e privati oggi possiedono strumentazioni di qRT-PCR o di ddPCR per le analisi routinarie richieste dal SSN; pertanto l'analisi di sequenze target codificate su una strumentazione ad oggi standard permette la trasferibilità dell'intero processo al SSN con possibilità di un rapido accreditamento del test nelle strutture di laboratorio diagnostico.

Il beneficio che potrà derivarne per la popolazione in primis e poi per il SSN sarà quello di individuare una fascia di popolazione a potenziale rischio di insorgenza di patologia neoplastica che sarà sottoposta a controlli, come quelli di screening oggi già presenti sul territorio nazionale. In questo senso si prevede il suo utilizzo soprattutto per l'individuazione precoce dei tumori alla mammella in donne giovani che non rientrano nei programmi di screening, verso le quali la LILT Nazionale pone particolare attenzione. La diagnosi precoce e un sensibile monitoraggio della risposta terapeutica, come è noto, riduce i costi sanitari: il modello proposto legato ad un biomarcatore predittivo permetterà stocasticamente di controllare i costi sanitari indotti relativi alla area oncologica.

PROGRAMMAZIONE DELLA RICERCA:

Anno 1:

- Per ogni partecipante allo studio, dopo colloquio dedicato e firma dell'apposito consenso informato (con approvazione del Comitato Etico Regionale locale), verranno raccolti i campioni di sangue periferico. In dettaglio: nei primi 18 mesi dall'inizio del progetto

verranno raccolti i campioni biologici di sangue relativi a pazienti con diagnosi di neoplasia mammaria “early” (300); patologia benigna mammaria (300). Questi campioni saranno relativi ai “casi” così definiti nello studio. Il servizio Immunotrasfusionale dell’Azienda Ospedaliero Universitaria di Trieste, in stretta collaborazione con le Associazioni di Donatori di Sangue presenti sul territorio, ADS e AVIS di Trieste, fornirà campioni di sangue di volontari apparentemente sani (200 donne) che costituiranno il controllo dello studio. Subito dopo il prelievo si procederà all’estrazione automatica del cfDNA che verrà poi conservato in una bio-banca dedicata.

- Da ciascun caso-controllo verranno prelevati 24 mL di sangue aliquotati in quattro distinte provette contenenti anticoagulante EDTA (Sistema Vacuette), numerate in senso crescente (da 1 a 4) a partire dalla *venipuncture*. In tutti i casi, le prime due provette verranno utilizzate per l’analisi del DNA libero plasmatico, mentre le altre due verranno conservate per uso successivo.
- Subito dopo il prelievo si procederà all’estrazione automatica del cfDNA mediante strumento MagnaPure con kitQIAamp Blood Mini kit-Qiagened. Il cfDNA che verrà poi conservato in una bio-banca dedicata presso le UO di riferimento partecipanti al progetto. Ogni *step* verrà svolto sia presso la UO di Terapia Molecolare e Farmacogenomica dell’AO di Cremona sia presso l’UCO di Anatomia Patologica di Cattinara/Trieste. Solo per i controlli si farà riferimento servizio Immunotrasfusionale dell’Azienda Ospedaliero Universitaria di Trieste e verranno unicamente gestiti dalla UCO di Anatomia e Istologia Patologica di Cattinara/Trieste.

Anno 2:

- Mese 18- 21: si procederà all’analisi mediante ddPCR (Biorad) dei geni target (ALU e LINE1) al fine di procedere alla definizione quantitativa e qualitativa del cfDNA e cfDI. Ogni *step* verrà svolto sia presso la UO di Terapia Molecolare e Farmacogenomica dell’AO di Cremona sia presso l’UCO di Anatomia e Istologia Patologica di Cattinara/Trieste. Solo per i controlli si farà riferimento all’UCO di Anatomia Patologica di Cattinara/Trieste.
- Mese 20-24: si procederà all’analisi statistica ed al “budget impact analysis” dei dati ottenuti e loro effetto prospettico, se positivi, sul SSN e gestione di eventuale inserimento nei piani di screening. La simulazione verrà eseguita dal CERGAS dell’Università Bocconi di Milano.

METODOLOGIA:

Il cfDNA verrà estratto mediante procedura automatica con strumento MagnaPure con kit della QIAamp Blood Mini kit-Qiagen. Il cfDNA estratto verrà conservato in *vials* dedicate individuate in con barcode in apposita sieroteca/bio banca sino all'esecuzione dell'analisi previste dal progetto. Le analisi oggetto di questo studio verranno effettuate mediante metodiche di ddPCR ottimizzate nel nostro laboratorio attraverso la misurazione di sequenze target quali ALU e LINE1 (6) in 200 donne sane (controlli) verso 300 donne affette da neoplasia mammaria e 300 da neoplasia benigna. La performance del test verrà valutata tramite la curva ROC. L'associazione tra concentrazioni di DNA e le principali variabili demografiche, cliniche e patologiche verrà esaminata con modelli di regressione logistica e lineare multipla al fine di avere un quadro completo della situazione clinica e del ruolo biologico del cfDNA in ogni singolo paziente.

UNITA' di RICERCA e PERSONALE DEDICATO AL PROGETTO

L'Unità di Terapia Molecolare e Farmacogenomica dell'AO di Cremona ha come intento lo studio molecolare dei tumori e le implicazioni cliniche (intesa come responsività/resistenza a nuovi farmaci oncologici, che attualmente rivestono un ruolo importante nel trattamento dei tumori). L'Unità di Ricerca vanta programmi di collaborazione con Università di Melbourne (AUS) e Università di Oxford (UK) sul tema dello studio proposto. Il laboratorio è prevalentemente concentrato sullo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali e le loro nuove combinazioni terapeutiche; sulla biologia dei tumori e nuovi modelli sperimentali più adeguati per lo studio e lo sviluppo di nuovi trattamenti. Inoltre, l'Unità di Ricerca è focalizzata sull'individuazione di nuovi marcatori, quali la biopsia liquida, potenzialmente utili alla caratterizzazione della neoplasia e risposta alla terapia e al monitoraggio dell'andamento delle malattia oncologica. Il laboratorio ha tutte le strutture e le attrezzature necessarie per seguire il progetto presentato (cappe sterili, estrattore automatico di acidi nucleici; qRTPCR, ddPCR, ecc). Nel progetto sono coinvolti per la parte laboratoristica e gestionale il Responsabile del Progetto, Prof. Daniele Generali, Professore Associato di Oncologia Medica- Dipartimento di Scienze Cliniche, Chirurgiche e della Salute- Università di Trieste, un biologo con expertise specifica, dr.ssa Maria Rosa Cappelletti, ed un tecnico di laboratorio, Chiara Senti; la parte di recupero dei controlli e la gestione del colloquio/prelievo saranno curati dal Prof Daniele Generali e Dr Alberto Bottini.

La UCO di Anatomia e Istologia Patologica di Cattinara/Trieste ha come intento l'analisi dei tessuti tumorali e l'analisi biomolecolari volte ad fornire informazioni utili al clinico per delineare la prognosi e la strategia terapeutica ottimale per ogni singolo paziente. Dispone di

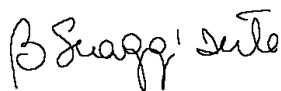
strumentazione all'avanguardia sia in termini di analisi laboratoristica (qrTPCR, Maldi/TOFF, Pyrosequenziatore) sia in termini di biobanca. Nel progetto sono coinvolti per la parte di laboratorio il Prof Fabrizio Zanconati, Prof. Associato -Dipartimento di scienze Cliniche, chirurgiche e della Salute- Università di Trieste, Direttore della UCO di Anatomia, Istologia e Citologia Patologica di AOOTS, Prof Bruna Scaggiante, Ricercatore in biologia molecolare- Dipartimento Scienze della Vita-Università di Trieste; per la parte di recupero dei controlli e gestione del colloquio/prelievo la Prof Marina Bortul, Professore associato di Chirurgia Generale del Dipartimento di Scienze Cliniche, Chirurgiche e della Salute-Università di Trieste e Responsabile di Struttura semplice di Chirurgia Senologica per AOOTS. Altri partecipanti al progetto sono il Prof. Giorgio Mustacchi, oncologo, in qualità di consulente e supervisore del progetto; Dr. Fabiola Giudici statistica della Breast Unit di Trieste; Dr. Cristina Bottin Tecnico universitario di laboratorio di Anatomia e Istologia Patologica che collaboreranno alla costituzione della biobanca e alla informatizzazione dei dati; gli specializzandi Dr Maurizio Pinamonti, Dr.ssa Deborah Bonazza e Dr Davide Rozze con funzioni di supporto alla ricerca per la raccolta sistematica delle caratteristiche clinica e patologica dei casi; il Dr Luca Mascaretti, Direttore del Dipartimento Interaziendale del Dipartimento Immunotrasfusionale e di Banca del Sangue dell'Area Vasta Giuliano Isontina per i controlli da donatori sani. Nell'ambito del progetto saranno bandite borse di ricerca per giovani biologi/biotecnologi/tecnici di laboratorio biomedico.

Il CERGAS promuove, coordina e svolge attività di ricerca di base e applicata sugli assetti, le dinamiche e le performance delle aziende e dei sistemi di aziende operanti nei settori sanitario, socio-sanitario, socio-assistenziale e socio-educativo. Utilizza i principi, le metodologie e gli strumenti propri dell'economia aziendale e del management pubblico per supportare le istituzioni e le aziende che rispondono ai bisogni di salute, di benessere e di sviluppo delle persone. L'attività di ricerca del CERGAS si articola in cinque macro aree, Health Economics & HTA, Health Policy, Healthcare Management, Non profit e Social services che mirano ad investigare tutti gli aspetti della sanità, integrandosi tra loro. Le analisi di "budget impact analysis" e la simulazione dei dati ottenuti in un potenziale modello di SSN verrà seguito da Prof Sergio Venturini della SDA Bocconi. Le LILT di Trieste, Cremona e Udine con i loro Presidenti daranno il loro supporto alla ricerca, coordinando la rete di ricerca e i programmi di formazione per i giovani, nonché organizzando workshop e convegni sul tema. E' previsto anche l'impegno delle LILT, nel rispetto delle realtà territoriali, a favore dell'educazione sulla prevenzione oncologica e sull'innovazione in tema di ricerca bio-medica per la cittadinanza e i giovani delle scuole secondarie di secondo grado.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Pinzani P, Salvianti F, Pazzagli M, Orlando C. Circulating nucleic acids in cancer and pregnancy. *Methods*. 2010; 50:302-307
- 2 Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker. A critical appraisal of the literature. *Clinica Chimica Acta* 2010; 441: 1611-1624
- 3 Stebbing J, Bower M. Cell free DNA as a biomarker in the context of cancer, viruses, and methylation. *JID* 2012; 205: 1032-1034
- 4 Van der Vaart M, Pretorius PJ. Is the role of circulating DNA as a biomarker of cancer being prematurely overrated? *Clinical Biochemistry*. 2010; 43: 26-36
- 5 Aung KL, Board RE, Ellison G, Donald E, Ward T, Clack G, Ranson M, Hughes A, Newman W, Dive C. Current status and future potential of somatic mutation testing from circulating free DNA in patients with solid tumors. *HUGO J*. 2010; 4: 11-21
- 6 Circulating tumour markers can define patients with normal colons, benign polyps, and cancers. Mead R, Duku M, Bhandari P, Cree IA. *Br J Cancer*. 2011 Jul 12;105(2):239
- 7 Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, Dunning MJ, Gale D, Forshew T, Mahler-Araujo B, Rajan S, Humphray S, Becq J, Halsall D, Wallis M, Bentley D, Caldas C, Rosenfeld N. *N Engl J Med*. 2013 Mar 28;368(13):1199-209

Il Presidente LILT Trieste,
Prof. Bruna Scaggiante



Il Responsabile del progetto,
Prof. Daniele Generali



Trieste, 1 dicembre, 2015

