

Circolare n. **26**
vc

Roma

**Ai Presidenti e Commissari
Sezioni Provinciali LILT**

**Ai Coordinatori delle Unioni Regionali delle
Sezioni Provinciali LILT**

comunicata via e-mail

Loro sedi

Oggetto: progetto nazionale "La Prevenzione del III° millennio: la biopsia liquida".

Il Consiglio Direttivo Nazionale della LILT, nella seduta del 20 ottobre e del 17 novembre scorsi, ha esaminato – tra l'altro – il progetto di ricerca trasmesso alla Sede Centrale dalla Sezione Provinciale di Perugia, concernente "La Prevenzione del III° millennio: la biopsia liquida".

Trattasi, in particolare, di un progetto basato sull'utilizzo di approcci molecolari – per il tramite della collaborazione con la Sezione di chirurgia oncologica della mammella dell'Università di Perugia – di identificazione di piccoli frammenti di dna rilasciati dal tumore della mammella nel circolo sanguigno.

L'applicazione di tali protocolli nella clinica avanzata – risulta oramai di acclarata evidenza scientifica – consente una più completa ed esauriente conoscenza della eziologia biologica di alcuni tumori con una metodologia assolutamente non invasiva, nel rispetto del paziente e di una ridotta ospedalizzazione.

La citata Sezione Provinciale ha proposto al Consiglio Direttivo Nazionale di acquisire presso il Laboratorio di biologia molecolare della predetta Università di Perugia i campioni delle pazienti trattate presso tutte le Sezioni Provinciali del territorio nazionale che riterranno di aderire al progetto. Sono state previste modalità di accettazione di detti campioni particolarmente efficaci e, comunque, rispettose delle vigenti disposizioni normative in tema di privacy, consenso informato e indicazioni espresse dal Comitato Etico in tema di conservazione e processazione.

In considerazione di quanto sopra esposto il Consiglio Direttivo Nazionale, con la presente, ha ravvisato l'opportunità di sottoporre preliminarmente all'attenzione di codeste Sezioni Provinciali il progetto di cui trattasi – che, si rammenta, è stato altresì già valutato

dal Comitato Scientifico Nazionale LILT – prima di assumere ogni determinazione in merito.

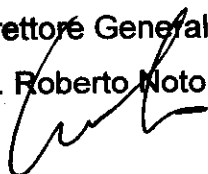
Solo dopo aver acquisito l'adesione di codeste Sezioni Provinciali medesime, infatti, si procederà all'eventuale approvazione dello studio ed alla definizione delle risorse necessarie alla realizzazione su tutto il territorio nazionale.

Ciò stante, nell'allegare copia del citato progetto – per una più esauriente conoscenza delle SS.LL. – si invita a comunicare a questa Sede Centrale, l'eventuale adesione da parte delle Sezioni interessate.

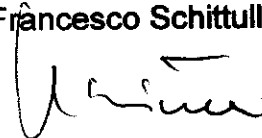
Stante l'urgenza, si gradirà ricevere un riscontro alla presente entro il 20 dicembre p.v..

L'occasione è gradita per inviare i più cordiali saluti.

Il Direttore Generale
Dott. Roberto Noto



Il Presidente
Prof. Francesco Schittulli



LEGA ITALIANA per la LOTTA contro i TUMORI

Sezione Provinciale di Perugia

“ La prevenzione del III millennio: la biopsia liquida “

Tra poco più di cinque anni, il 25 febbraio 2022, celebreremo i **100 anni di attività** della LILT e l'auspicio che ci dobbiamo porre oggi è quello che la guaribilità, per una grave e frequente malattia come il tumore al seno, si avvicini sempre di più al nostro obiettivo finale: **mortalità zero!**

Compito istituzionale primario della Lilt è la prevenzione e, nella prospettiva della “era moderna”, la vera prevenzione può essere rappresentata dalla ricerca.

Ricerca Scientifica che storicamente è parte integrante delle attività istituzionali della LILT. Anche nel nuovo Statuto le attività finalizzate a tale azione hanno mantenuto un ruolo preminente.

Nel nostro paese, l'85 % di chi si è ammalato cinque anni fa è ancora in vita oggi. È un risultato eccezionale. Ma a Copenaghen, al congresso europeo di oncologia (Esmo, ottobre 2016), lo sguardo è stato rivolto soprattutto a chi non è guarito.

Non è possibile dimenticare, infatti, che per il 20-30% delle donne il tumore si riaffaccia. E di cancro al seno metastatico si muore: nel 2013 sono decedute quasi 12 mila donne, un numero che fa di questa neoplasia la prima causa di morte oncologica nella popolazione femminile. Ed ecco perché arrestare l'avanzamento della malattia – cioè prolungare la sopravvivenza libera dalla progressione della malattia, mantenendo al contempo una buona qualità di vita – è la vera **grande sfida** per chi si occupa di ricerca nel campo del tumore al seno.

A base della biopsia liquida c'è una "idea" di identificare piccoli frammenti di dna rilasciati nel circolo sanguigno dal tumore; qualcosa di simile a quanto fanno le cellule fetali nel circolo materno durante la gravidanza.

L'utilizzo di approcci molecolari avanzati in campo oncologico ha determinato un profondo avanzamento della comprensione dei meccanismi alla base dell'insorgenza e sviluppo delle patologie neoplastiche. Sebbene siano ormai noti molti marcatori di utilizzo clinico che concorrono alla diagnosi e al trattamento farmacologico del paziente, ancora molto deve essere chiarito in merito alla eterogeneità dei tumori.

Nella routine classica, gli studi biotici - a partire da tessuti operatori in FFPE - permettono la caratterizzazione molecolare del tumore nel momento in cui avviene il prelievo. Difficilmente da tali informazioni sarà possibile prevedere l'evoluzione del tumore o per meglio dire l'insorgenza di mutazioni in grado di garantire resistenza ad un farmaco o di innescare processi metastatici.

Si fa quindi sempre più urgente l'esigenza di approcci molecolari che permettano lo studio del tumore come un *moving target*, un bersaglio in continua evoluzione e trasformazione e, a tale riguardo, negli ultimi anni l'introduzione della *biopsia liquida* associata ad approcci genomici avanzati ha permesso di caratterizzare da un punto di vista molecolare il DNA circolante (cfDNA) e le cellule tumorali circolanti (CTC) presenti nel flusso ematico.

L'introduzione di tali approcci nella clinica avanzata ha permesso una comprensione più completa della biologia di alcuni tumori con una metodologia assolutamente **non invasiva**, nel rispetto del paziente e di una ridotta ospedalizzazione.

Come descritto da Krebs et al (2014), la possibilità di poter analizzare contestualmente la frazione del DNA circolante e delle CTC sarebbe in grado di fornire un'informazione molto più completa sulla risposta ai farmaci e sulla eterogeneità del tumore rispetto a quanto offerto dai marcatori tumorali classici.

La Sezione Provinciale Lilt di Perugia con la Sezione di Chirurgia Oncologica della Mammella e dei Tessuti Molli dell'Università di Perugia sono disponibili a realizzare questo progetto che nello specifico prevede quanto di seguito specificato.

Previo Consenso Informato, le pazienti affette da patologia neoplastica, early breast cancer, saranno sottoposte ad un prelievo di sangue periferico di 7,5 ml con la seguente tempistica:

- 1° prelievo: preoperatorio al momento del ricovero (prelievo basale al tempo 0);
- 2° prelievo: al termine delle terapie adiuvanti (per valutare eventuali modificazioni fenotipiche/genotipiche delle CTC con riferimento alla transizione epitelio-mesenchimale e/o allo stato mutazionale del cfDNA);
- 3° prelievo a sei mesi dal termine delle terapie (monitoraggio numerico e valutazione genotipica delle CTC e del cfDNA), inoltre valutazione del rapporto beneficio/resistenza delle terapie adiuvanti
- 4° prelievo a un anno dal termine delle terapie (monitoraggio numerico e valutazione genotipica delle CTC e del cfDNA), inoltre valutazione del rapporto beneficio/resistenza delle terapie adiuvanti
- 5° prelievo a due anni dal termine delle terapie (monitoraggio numerico e valutazione genotipica delle CTC e del cfDNA), prelievo finale a chiusura dello studio*.

*in base ai risultati ottenuti e alla disponibilità dei fondi si proporrà di continuare lo studio per un follow-up di 10 anni

Gli obiettivi dello studio sono:

obiettivo primario:

validare la ricerca delle CTC e cfDNA come metodo di follow up a lungo termine, con minimo impatto traumatico e psicologico per la paziente.

obiettivo secondario:

valutare:

- l'efficacia nella diagnostica precoce della ripresa di malattia.

- impatto sulla riduzione della spesa sanitaria (riduzione degli esami strumentali nel follow-up, del carico di lavoro per le strutture ospedaliere, riduzione degli effetti indesiderati da terapie radianti).

Le specificità di questo progetto è, inoltre, la disponibilità della Sezione Provinciale di Perugia e della S.S.Dip. Breast Unit di mettersi a disposizione di tutte le Sezioni Provinciali della Lilt che ritengono di partecipare a questa iniziativa.

L'acquisizione dei campioni presso il nostro Laboratorio di Biologia Molecolare avverrà secondo le seguenti modalità:

- per le pazienti afferenti alla S.S. Dip. Breast Unit di Perugia il primo prelievo sarà effettuato al momento del ricovero;
- per le pazienti delle Sezioni Provinciali del territorio nazionale i campioni saranno accettati tramite corriere, da elenco ufficiale (anche email) stabilito dalle Sezioni stesse;
- per le pazienti in cui per problemi organizzativi o di privacy non sia possibile effettuare il prelievo nella sede di residenza, il Laboratorio sarà disponibile ad eseguirlo localmente nei giorni martedì e giovedì dalle 8:00 alle 14:00 o su appuntamento.

Nell'attesa di processare il campione, il prelievo sarà conservato alla temperatura di -80° C.

Ad ogni paziente verrà consegnato Foglio Informativo sugli obiettivi della ricerca.

I risultati, nel rispetto della privacy, saranno comunicati alla paziente e al Responsabile individuato dalle singole Sezioni Provinciali LILT tramite specifico software online, basato sulle indicazioni espresse dal Comitato Etico.

I campioni perverranno alla Sezione attraverso il corriere previa opportuno inserimento in un kit messo a disposizione per la corretta conservazione.

In pochi mesi potrà conseguirsi, così, un numero di campioni esaminati, non meno di 2.000, che, attraverso un' analisi bio informatica, ci permetterà:

- 1) **meglio caratterizzare il tumore** del campione esaminato per una terapia personalizzata
- 2) **mettere in condizione la LILT di disporre di un nuovo sistema di prevenzione oncologica efficace.**

Si invitano le Sezioni Provinciali e/o le Unioni Regionali a rispondere a questa missiva manifestando la disponibilità a partecipare allo studio.

Progetto di Ricerca

“La prevenzione del III° millennio: la biopsia liquida”

Promotore (no profit)

Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori

Centro Coordinatore

Università degli Studi di Perugia, Sezione di Chirurgia Oncologica della Mammella e dei Tessuti Molli, Dip. Scienze Chirurgiche e Biomediche.

Sperimentatore Coordinatore

Prof. Antonio Rulli

Responsabile Sezione Chirurgia Oncologica della Mammella e dei Tessuti Molli

Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Biomediche

Università degli Studi di Perugia

Coordinatori Scientifici, Università degli Studi di Perugia

Prof. Antonio Rulli

Prof. Angelo Sidoni

Gruppo di lavoro

Prof. Antonio Rulli, Chirurgia Oncologica Mammella e Tessuti Molli, Università di Perugia;

Prof. Angelo Sidoni, Anatomia e Istologia Patologica, Università di Perugia;

Prof. Lucio Crinò, Oncologia Medica, Università di Perugia;

Prof. Cynthia Aristci, Radioterapia Oncologica, Università di Perugia;

Prof. Emilio Donti, Genetica Medica, Università di Perugia;

Prof. Fabrizio Stracci, Registro Tumori Umbro di Popolazione;

Dr.ssa Francesca Rossi, Data Manager, Università di Perugia.

Dr.ssa Francesca Crucianelli, Bio statistico, Università di Perugia

Dr.ssa Cristina Pelliccia, Biotecnologo Medico, Università di Perugia;

Segreteria Scientifica

Dr.ssa Cristina Pelliccia

Dr.ssa Francesca Rossi

Statistica

Dr.ssa Francesca Rossi

Sezione di Chirurgia Oncologica della Mammella e dei Tessuti Molli, Università degli Studi di Perugia

Comitato Etico

CEAS Umbria

Sommario:

introduzione	pag. 3
precedente esperienza: la firma genetica	pag. 5
la biopsia liquida:razionale	Pag. 7
obiettivi dello studio	pag. 9
materiali e metodi	pag. 9
configurazione tecnologica	pag. 11
analisi statistica	pag. 13
aspetti tecnico-organizzativi	pag. 14
autorizzazioni	pag. 14
gruppo di lavoro	pag. 15
bibliografia	pag. 16

INTRODUZIONE

In Italia si stima che vi sia un'incidenza di circa 48000 casi all'anno di cancro della mammella con un lento ma costante aumento di incidenza, dovuto anche all'aumento della popolazione anziana. Un percentuale di circa il 25-30% riguarda, tuttavia, pazienti fra 25 e 45 anni. La sopravvivenza per cancro al seno, in Italia, si assesta intorno all'85% con il 30% circa di mortalità a 15 anni (1, 19). A fronte dell'aumento di incidenza, la mortalità assoluta non è aumentata, anzi negli ultimi anni si è osservata una tendenza verso una modesta riduzione dei decessi. Ciò è dovuto a diversi fattori, sociali, organizzativi e scientifici: l'informazione la sensibilizzazione della popolazione hanno portato ad un incremento delle diagnosi precoci, le conoscenze biologiche sul tumore sono aumentate, la neoplasia viene affrontata con un approccio multidisciplinare, le terapie chirurgiche e mediche sono più efficaci e sono stati introdotti nuovi farmaci (1).

Nella regione umbra nel periodo 1994-2007 si è avuto un aumento di incidenza sino al 2001, probabilmente anche per l'introduzione dello screening di popolazione. La mortalità ha iniziato a ridursi, invece, anche prima del 2001 (17).

La diagnosi precoce rimane una pietra miliare per la riduzione della mortalità. La maggior parte degli strumenti oggi disponibili per la diagnosi, tuttavia, presenta margini di inadeguatezza, in particolare l'esame clinico e l'autopalpazione, ma anche l'ecografia mammaria. La stessa mammografia ha una sensibilità limitata nelle donne di età inferiore a 45 anni, mentre le metodiche più recenti, come la tomosintesi e la RMN, sono fondamentalmente complementari alla mammografia e non sono candidabili per uno uso estensivo, come sarebbe necessario per lo screening (2,3).

Il cancro della mammella, più che una singola malattia eterogenea, è da considerarsi costituita da differenti malattie con caratteristiche cliniche, biologiche e di storia naturale diverse. Anche se i sottogruppi sono probabilmente più di 10, vi è un sostanziale accordo nel considerare almeno 3 fenotipi profondamente diversi fra di loro: luminale, "basal-like", HER2+ (15,16). Il fenotipo luminale è quello più comune e, nonostante l'aspetto istopatologico di bassa aggressività, presenta una notevole varietà di comportamento clinico-biologico, in particolare il sottotipo luminale B, che è caratterizzato da una quota significativa di recidive entro 10 anni.

L'identificazione di nuovi parametri biomolecolari che consentano di stimare il rischio e di predire la risposta ai farmaci è quindi auspicabile al fine di orientare le scelte terapeutiche in maniera più appropriata e modellata sulle effettive necessità (13). La conoscenza delle caratteristiche biologiche è inoltre essenziale per lo sviluppo di nuovi farmaci (4,23).

Lo studio del profilo genetico dei tumori consente già ora di identificare le mutazioni che guidano la cancerogenesi ("driver") o che contribuiscono a definire il fenotipo tumorale. Tale profilo può essere surrogato dalle valutazioni istopatologiche o può essere ottenuto sul tessuto neoplastico di provenienza chirurgica o biotica. Tali valutazioni, tuttavia, descrivono un profilo statico e non rendono conto della dinamicità biologica del tumore e della frequente acquisizione di nuove mutazioni. Per poter raggiungere tale obiettivo sarebbe necessario effettuare ripetute biopsie, con una inaccettabile invasività diagnostica. D'altra parte nelle condizioni di assenza di malattia macroscopica, come nel corso o dopo la terapia adiuvante, non esiste il tessuto su cui poter effettuare una biopsia.

Poiché le cellule tumorali possono raggiungere il circolo ematico e poiché le cellule apoptotiche o in necrosi, a loro volta, liberano frammenti di DNA nel torrente ematico, il sangue può rappresentare una fonte di ottimali cellule tumorali e di DNA, potenzialmente in grado di offrire le medesime informazioni del DNA ed informazioni aggiuntive derivanti non solo dalla lesione primaria, ma anche dalle metastasi.

La cosiddetta biopsia liquida potrebbe quindi fornire nuove conoscenze sul processo di sviluppo tumorale e chiarire quali sono le vie di segnalazione coinvolte nell'invasione e metastatizzazione tumorale. La biopsia liquida può essere di grande utilità nella scelta terapeutica e nell'identificazione precoce di cloni resistenti. Un campo potenzialmente molto promettente della biopsia liquida riguarda inoltre la sua utilizzazione nello screening e nella diagnosi precoce di malattia minima residua (26).

PRECEDENTE ESPERIENZA: la firma genetica

(Progetto finanziato dalla Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori – Bando di Ricerca Sanitaria 2014.)

Dal Registro Tumori Umbria di popolazione abbiamo reperito i dati di sopravvivenza di un gruppo di pazienti con diagnosi di carcinoma mammario formulata nel biennio 1994/1995 con l'intento di poter disporre di un lungo periodo di follow-up. Il gruppo, composto da 55 pazienti, tutte sottoposte ad intervento chirurgico, è stato poi suddiviso in 2 sottogruppi numericamente bilanciati: uno con una lunga sopravvivenza ed uno con sopravvivenza inferiore a 4 anni:

- n° 30 pazienti stadiati, in vita al 31/12/2013, con sopravvivenza superiore a 20 anni dalla diagnosi
- n° 25 pazienti, stadiati in morte, con sopravvivenza inferiore a 4 anni dalla diagnosi

Sulla base di questo elenco sono stati reperiti i relativi campioni tissutali, fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), conservati nell'istoteca della S.C. di Anatomia e Istologia Patologica dell'Ospedale di Perugia eliminando tutti i campioni che, ad una prima ispezione visiva, non risultavano idonei per mancanza di materiale biologico nel blocchetto originale di inclusione.

I rimanenti campioni, per un totale di 33 casi, sono stati tutti caratterizzati nuovamente dal punto di vista bio-patologico attraverso un pannello immunoistochimico dedicato: ER, PgR, Ki67, HER2 e sottoposti alla valutazione microscopica dell'anatomo-patologo che così ha potuto identificare due gruppi di carcinomi: Luminali e non Luminali (secondo i criteri San Gallen 2011 e seguenti).

Il I° sequenziamento di 26 campioni ha evidenziato i geni differenzialmente espressi nei luminal (vita/morte) e nei non Luminal (vita/morte) utilizzando gli strumenti bioinformatici *edgeR* e *DESeq2* in ambiente R/Bioconductor usando i seguenti settaggi: *DESeq2* $p\text{Value} < 0.05$, $P \text{ adjusted value} < 0.1$; *edgeR* $P \text{ value} < 0.05$, $FDR < 0.1$.

Il risultato finale ha evidenziato 28 geni iperespressi di cui 23 nei luminal e 5 nei non luminal. Due, di questi 28 geni sono sempre presenti in entrambi i gruppi: un gene di vita (CXCL13) ed un gene di morte (IFITM10). Il risultato ottenuto rappresenta un Codice a Barre del carcinoma mammario.

Un II° sequenziamento è stato eseguito su 12 campioni di pazienti operate nel 2005 con fenotipo luminale, biologicamente valutati anche con il test genetico commerciale Endopredict, che sono stati confrontati anche con tessuto sano. L'analisi bioinformatica ha calcolato l'espressione differenziale dei campioni Luminal (1994-2005) nel confronto tumore/sano (TH) e vita/morte (AD) ed è stata condotta sempre con *DESeq2* e *edgeR* in ambiente R/Bioconductor con i seguenti settaggi: *DESeq2*: $P\text{value} < 0.05$; $P \text{ adjusted value} < 0.05$ *edgeR*: $P\text{value} < 0.05$; False Discovery Rate < 0.05

Un primo risultato fondamentale è stato riscontrare una netta distinzione di espressione genica tra il tessuto sano e quello neoplastico. Comparando i geni che risultano differentemente espressi nei due confronti (TH e AD), un gene identificato da *DESeq2* è over-espresso sia nel tessuto tumorale rispetto al controllo sano, che nei pazienti deceduti rispetto a quelli in vita.

Questo gene si chiama GINS1 e codifica per una proteina che è parte di un complesso (GINS) che promuove l'iniziazione e la progressione della replicazione del DNA ("Structure of the human GINS complex and its assembly and functional interface in replication initiation", Kamada K. et al., Nat Struct Mol Biol, 2007).

Altri geni overespressi sono: UBE2C, MMP11, MKI67 e ATM.

Il risultato finale del nostro primo studio è stato quello di evidenziare un codice di 33 geni che caratterizzano il cancro della mammella. Il 43% dei geni isolati sono comuni tra il I° e il II° Sequenziamento. Sette dei nostri geni si ritrovano nei test genetici commerciali PAM50, Oncotype ed Endopredict: quattro sono presenti nel Panel Cancer targets 50 genes dello Ion AmpliSeq (14,18).



Azienda Ospedaliera Universitaria di Perugia
S. S. Dip. BREAST UNIT
Resp.: Prof. Antonio Rulli



"Nuove frontiere nella diagnosi e nel trattamento personalizzato del cancro della mammella: la firma genetica"
Progetto finanziato dalla Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori - Bando di Ricerca Sanitaria 2014 (cinque per mille anno 2013)

Il codice a barre



AR51/2015 - LILT

I° SEQUENZIAMENTO RBFOX1, IFITM10, OGDHL, NPY1R, KCNE4 (luminal), SNCG, PIEZO2 (non luminal) (DESeq2); CXCL13, TNNI1, PYGM, NEB, FHL1, KLH41, ACTN2, AAMD, TTN, CA3, LDB3, CEACAM6, CTSD, MB, DLX2, CEACAM5, PLA2G2A, NDUFC2, DSCAM-AS1 (luminal), KRT81; LINGO1 (non luminal) (edgeR).

II° SEQUENZIAMENTO GINS1, UBE2C, MMP11, MKI67, ATM

Brevetto AR51/2015 Lilt - Unipg

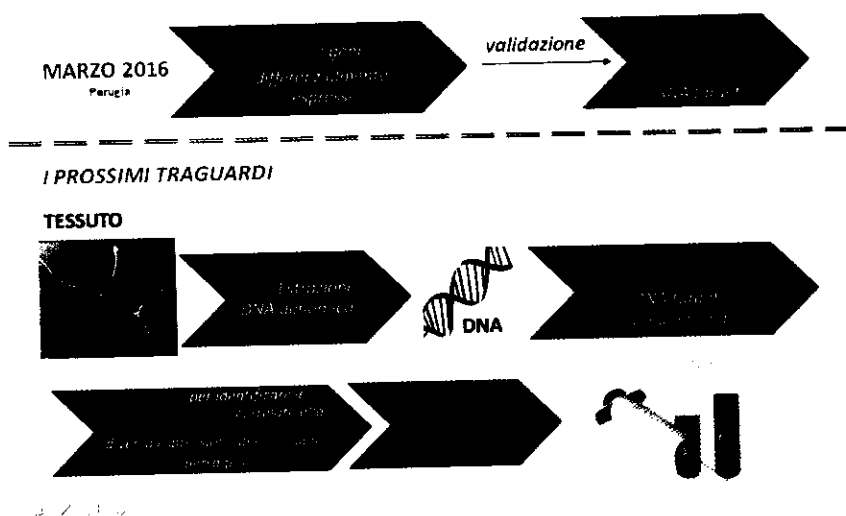
LA BIOSIA LIQUIDA: Razionale

L'esigenza di nuovi approcci molecolari che permettano lo studio del tumore come moving target, un bersaglio in continua evoluzione e trasformazione, diventa sempre più urgente. Negli ultimi anni l'introduzione di approcci genomici avanzati ha permesso di caratterizzare da un punto di vista molecolare il DNA circolante (cfDNA) e le cellule tumorali circolanti (CTC) presenti nel flusso ematico. L'ipotesi alla base della biopsia liquida consiste nella possibile identificazione e caratterizzazione delle cellule tumorali e dei frammenti di DNA rilasciati dal tumore nel circolo sanguigno (25).

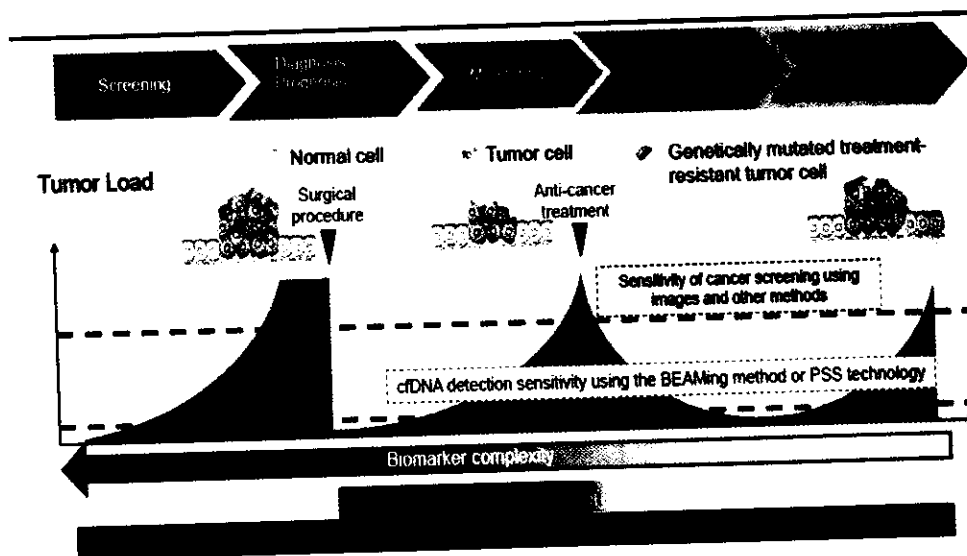
Come descritto da Krebs et al. (2014) la possibilità di poter analizzare le CTC e la frazione di DNA circolante può fornire un'informazione molto più completa sulla risposta ai farmaci e sulla eterogeneità del tumore rispetto a quanto offerto dai marcatori classici. L'introduzione di tale approccio in clinica ha permesso la comprensione più completa della biologia tumorale con una metodologia non invasiva, nel rispetto del paziente e senza necessità di ospedalizzazione.

Il codice a barre, da noi messo a punto, potrà essere utilizzato per valutare le varianti genetiche del paziente neoplastico con un semplice prelievo di sangue periferico, riducendo le indagini traumatiche, come le biopsie, e le ripetute esposizioni alle radiazioni (20,21,22).

Come arrivare ad una diagnosi rapida ed ad un trattamento adeguato:



Diverso livello di sensibilità di rilevazione del DNA da cellule tumorali circolanti o con altri metodi, tipo imaging (24).



OBIETTIVI DELLO STUDIO:

obiettivo primario:

- validare il valore predittivo delle CTC e cfDNA nella biopsia liquida

obiettivo secondario:

- valutare l'efficacia delle CTC e del cfDNA nella diagnostica precoce di recidiva
- valutare l'impatto sulla riduzione della spesa sanitaria

MATERIALI E METODI

Previo Consenso Informato le pazienti affette da carcinoma mammario in fase precoce suscettibili ad intervento chirurgico radicale, saranno sottoposte ad un prelievo di sangue periferico di 7,5 ml con la seguente tempistica:

- 1° prelievo: preoperatorio al momento del ricovero (prelievo basale al tempo 0);
- 2° prelievo: al termine delle terapie adiuvanti (per valutare eventuali modificazioni fenotipiche/genotipiche delle CTC con riferimento alla transizione epiteliomesenchimale e/o allo stato mutazionale del cfDNA);
- 3° prelievo a sei mesi dal termine delle terapie (monitoraggio numerico e valutazione genotipica delle CTC e del cfDNA), inoltre valutazione del rapporto beneficio/resistenza delle terapie adiuvanti
- 4° prelievo a un anno dal termine delle terapie (monitoraggio numerico e valutazione genotipica delle CTC e del cfDNA), inoltre valutazione del rapporto beneficio/resistenza delle terapie adiuvanti
- 5° prelievo a due anni dal termine delle terapie (monitoraggio numerico e valutazione genotipica delle CTC e del cfDNA), prelievo finale a chiusura dello studio*.

*in base ai risultati ottenuti e alla disponibilità dei fondi si proporrà di continuare lo studio per un follow-up di 10 anni

L'acquisizione dei campioni presso il nostro Laboratorio di Biologia Molecolare avverrà secondo le seguenti modalità:

- per le pazienti afferenti alla S.S. Dip. Breast Unit di Perugia il primo prelievo sarà effettuato al momento del ricovero;
- per le pazienti delle Sezioni Provinciali del territorio nazionale i campioni saranno accettati tramite corriere espresso, da elenco ufficiale (anche email) stabilito dalle Sezioni stesse;
- per le pazienti in cui per problemi organizzativi o di privacy non sia possibile effettuare il prelievo nella Sede di residenza, il Laboratorio sarà disponibile ad eseguirlo localmente nei giorni martedì e giovedì dalle 8:00 alle 14:00 o su appuntamento.

Nell'attesa di processare il campione, il prelievo sarà conservato alla temperatura di -80° C.

Ogni paziente riceverà un Foglio Informativo sugli obiettivi della ricerca e i potenziali rischi della partecipazione allo studio e dovrà firmare un Consenso Informato.

I risultati, nel rispetto della privacy, saranno comunicati alla paziente e al Responsabile individuato dalle singole Sezioni Provinciali LILT tramite specifico software online: Breast Unit Network, basato sulle indicazioni espresse dal Comitato Etico.

La parte scientifica del progetto è a carico del gruppo di ricerca dell'Università di Perugia. Necessitano:

- strumentazione per la ricerca delle CTC e DNA circolante
- prodotti di consumo
- 1 amministrativo per accettare e schedare tutti i campioni.
- 1 biologo molecolare

CONFIGURAZIONE TECNOLOGICA

Il flusso operativo proposto garantisce la possibilità di ottenere in circa 3 giorni di lavoro la caratterizzazione molecolare dell'assetto mutazionale del DNA germinale, del cfDNA e delle CTC del paziente garantendo il 100% di sensibilità per mutazioni fino all'1% (26).

Il flusso è così composto:

1. piattaforma Liquid Biopsy
2. flusso Next Generation Sequencing
3. flusso Digital PCR

Nella fase iniziale del progetto saranno utilizzati Kit presenti in commercio (Liquid Biopsy Platform-Cynvenio; Flusso NGS ION CHEF e ION S5; flusso Digital PCR lettore QuantStudio 3D digital PCR).

Successivamente verrà implementato il pannello di geni (codice a barre brevetto: AR51/2015 Lilt-Unipg) ottenuto con il precedente finanziamento Lilt.

1. La piattaforma Liquid Biopsy consente:

- la stabilizzazione del campione fino a 96 h a temperatura ambiente;
- l'arricchimento delle CTC automatizzato in grado di gestire 4 campioni in un tempo di 3 h con successiva colorazione delle stesse per immunofluorescenza ed eventuale enumerazione;
- una sensibilità massima di 3 CTC da 7.5 ml di sangue intero;
- il sistema, oltre a garantire un'elevatissima riproducibilità, permette di ottenere il recupero del 100% delle cellule individuate;
- flessibilità nell'utilizzo degli anticorpi per selezione positiva. L'operatore può utilizzare anticorpi di proprio interesse customizzando il processo;
- l'enumerazione e istologia: le CTC arricchite vengono successivamente permeabilizzate e colorate (diverse colorazioni istologiche sono permesse) al fine di garantire il controllo istologico del campione, ma soprattutto l'enumerazione della CTC, parametro necessario per prognosi e stadi azione della patologia;

2. Flusso Next Generation Sequencing:

- produzione delle library: la costruzione delle librerie a partire da DNA circolante e CTC avverrà utilizzando il sistema AmpliSeq ottimizzando su piattaforma Ion Chef partendo da un input minore di 1ng. Il robot permetterà, utilizzando cartucce pronte all'uso, di costruire le librerie d'interesse;
- Template Preparation: una volta prodotte le librerie di interesse, la strumentazione adeguatamente impostata, eseguirà senza intervento umano tutto il flusso di operazioni necessarie a:
 - creazione di beads monoclonali mediante ePCR;
 - arricchimento delle beads di interesse
 - caricamento e centrifugazione dei CHIP di corsa;
- Sequenziamento: il sequenziatore, avvalendosi di una tecnologia a semiconduttori basato su metodo di rilevazione a variazione di Ph, garantisce il più semplice e veloce flusso di lavoro per sequenziamento di regioni target di interesse o di esomi. La piattaforma, sfruttando cartucce pronte all'uso, necessita di soli 15 minuti per eseguire l'inizializzazione. Il tempo di sequenziamento varia solo in funzione della lunghezza di lettura di interesse

3. Flusso Digital PCR:

il sistema è una piattaforma per Digital PCR che utilizza chips microfluidici per la rilevazione e quantificazioni degli acidi nucleici altamente precisa e sensibile. Tramite l'utilizzo di chip con 20.000 micropozzetti è in grado di analizzare e misurare eventi rari prossimi allo 0.1% con accuratezza del 95%. La piattaforma garantisce analisi di mutazioni somatiche in campioni FFPE; analisi di Circulating Free DNA da sangue; analisi di Circulating Tumor Cells. Il sistema Ion S5™ include un server integrato (S5™ Torrent Server and Torrent Suite™ Software) che in grado di effettuare in maniera totalmente automatica tutti gli step analitici che vanno dalla pulizia e gestione del dato grezzo fino al basecalling e all'identificazione della variante, il tutto corredato da una accessibile interfaccia grafica e da una reportistica fruibile.

ANALISI STATISTICA

I risultati dell'analisi bioinformatica dei genotipi tumorali delle pazienti, unitamente all'andamento quantitativo/qualitativo delle CTC e cfDNA, saranno ottenuti attraverso piattaforma NGS ION-TORRENT.

La tecnologia Ion torrent produce, al termine del sequenziamento, dati grezzi con estensione .DAT.

Durante le fasi di mapping, le chiamate generate dalla pipeline automatica sono allineate al genoma di riferimento generando a loro volta delle metriche di qualità dell'allineamento (BAM file). Tutte le reads che non sono allineate in un primo step sono passate ad una seconda fase di analisi che sfrutta nuovi parametri e ulteriori algoritmi al fine di recuperare informazioni sempre garantendo il massimo livello di specificità. L'output dell'allineamento è un BAM file contenente tutte le reads mappate.

Al termine dei precedenti step di analisi, il Torrent Variant Caller (TVC) permette di visualizzare, in comode liste scaricabili le varianti di interesse associate valori di qualità e a varie informazioni. La suite di analisi permette di settare in maniera assolutamente semplice i parametri per chiamare, con parametri automatici settati di default, mutazioni in ambito germinale o somatico controllando la stringenza del accettare o rifiutare i falsi positivi. A seconda delle necessità l'operatore avrà modo di settare parametri customizzati sulle proprie esigenze o Germline per frequenze alleliche elevate (varianti presenti in più del 20% delle reads) o Somatic per frequenze alleliche rare (almeno una variante presente in meno del 20% delle reads), o Low stringency, ottimizzato per minimizzare false negative variant calls. o Customized parameters

In aggiunta a quanto sopra detto gli utilizzatori potranno avvalersi, per analisi dati più approfondite, della infrastruttura CLOUD per analisi terziarie ION REPORTER. Il sistema cloud permette di caricare BAM file, VCF file prodotti nei precedenti step di analisi al fine di avere una caratterizzazione sempre più specifica e solida attraverso la connessione a database di utilizzo frequente nella comunità scientifica (come dbSNP; COSMIC, OMIM®, GeneModel, GenePanel, SIFT scores, PolyPhen-2 scores, Grantham scores, PhyloP, Gene Ontology, Pfam. Il sistema è dotato inoltre di una serie di protocolli specifici per analisi molecolari avanzate che garantiranno una comparazione tra condizioni biologiche : sano vs malato - scoperta di mutazioni De Novo in un TRIO.

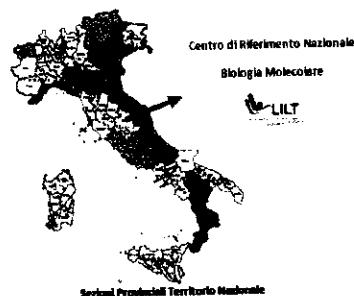
Il limite di rilevabilità (LOD) per le CTC e cfDNA sarà dell'1% , mentre per i campioni FFPE sarà del 10%. Per l'analisi delle CTC e del cfDNA, basato su un modello caso-controllo, il numero delle reads deve avere un valore soglia superiore a 2000 reads per amplicon, mentre, in caso di FFPE, in assenza di caso-controllo, dovrà avere un valore maggiore a 500 reads per amplicon. (26)

Secondo le linee guida REMARK (Reporting recommendations for tumor Marker prognostic study), i risultati della caratterizzazione molecolare di tutti i prelievi, saranno confrontati con l'evoluzione clinica dei singoli casi. Le curve di sopravvivenza saranno costruite secondo il metodo di analisi univariata di Kaplan-Meier applicando la regressione di COX, in modo da valutare la sopravvivenza libera da progressione di malattia (PFS, Progression Free Survival) e la sopravvivenza complessiva (OS, Overall Survival). La sopravvivenza libera da progressione di malattia (PFS) e la sopravvivenza

complessiva (OS) sono definite come il tempo trascorso tra la data di diagnosi e/o la data di progressione clinica della malattia, la morte, o la data dell'ultimo follow-up. L'utilizzo delle curve di Kaplan-Meier permette di poter tener conto di eventuali pazienti che si ritirino dallo studio prima che si possa osservare l'esito finale (dati censurati). Per determinare le associazioni tra la presenza di CTC, il loro numero e la concentrazione del cfDNA con le caratteristiche del tumore primario, verranno utilizzati il test Chi-Quadro o il Fisher Exact test. Il Fisher Exact test verrà applicato quando una o più cellule avrà un valore atteso meno di 5. La sensibilità e specificità del cfDNA e delle CTC verrà valutata mediante analisi della ROC curve (Receiver Operating Characteristic) rispetto ai controlli sani, i tests di log-rank verranno usati per rilevare significative differenze tra i gruppi. I risultati saranno considerati significativi per valori di $p < 0,05$.

ASPETTI TECNICO-ORGANIZZATIVI

La procedura sarà messa a punto in tre mesi circa con inizio previsto della ricerca nel gennaio 2017. La Sezione di Chirurgia Oncologica della Mammella e dei Tessuti Molli del Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Biomediche dell'Università degli Studi di Perugia e la Sezione Provinciale Lilt di Perugia sono disponibili a estendere questo progetto a tutte le Sezioni Lilt del Territorio Nazionale (Centro di Riferimento Nazionale di Biologia Molecolare LILT). I campioni perverranno alla Sezione attraverso corriere espresso previa opportuno inserimento in un kit messo a disposizione per il corretto trasporto e per l'adeguata conservazione. Orientativamente il costo per prelievo, escluso il trasporto, ed in base al n°, si aggirerà sui 400 Euro.



AUTORIZZAZIONI

Autorità Garante per la Privacy
CEAS, Comitato Etico Aziende Sanitarie, Umbria
Dipartimento Scienze Chirurgiche e Biomediche, Università degli Studi di Perugia
Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Perugia
Azienda Ospedaliera di Perugia.

GRUPPO DI LAVORO

Prof. Antonio Rulli,	Università degli Studi di Perugia	Responsabile del Progetto
		Chirurgia Oncologica Mammella e Tessuti Molli
Prof. Angelo Sidoni,	Università degli Studi di Perugia	Anatomia e Istologia Patologica
Prof. Lucio Crinò	Università degli Studi di Perugia	Oncologia Medica
Prof. Cynthia Aristei	Università degli Studi di Perugia	Radioterapia Oncologica
Prof. Fabrizio Stracci	Università degli Studi di Perugia	Registro Tumori Umbro di Popolazione
Prof. Emilio Donti	Università degli Studi di Perugia	Genetista
Dr.ssa Cristina Pelliccia	Università degli Studi di Perugia	Biotechnologo Medico
Dr.ssa F. Crucianelli	Università degli Studi di Perugia	Bio statistico
Dr.ssa F. Rossi	Università degli Studi di Perugia	Data Manager

Progetto presentato dalla Sezione Provinciale Lilt di Perugia, Presidente Anna Togni

BIBLIOGRAFIA

1. Survival of women with cancers of breast and genital organs in Europe 1999–2007: Results of the EUROCARE-5 study. Milena Sant, Maria Dolores Chirlaque Lopez, et alii -European Journal of Cancer, Volume 51, Issue 15, 2015.
2. Breast Cancer Screening – Viewpoint of the IARC Working Group- B. Lauby-Secretan, et alii- The New England journal of Medicine, June 11- 2015;
3. Breast Cancer screening, incidence, and mortality across US Counties. Harding C., Pompei F., Welch HG., et alii. JAMA Intern Med. 2015 Sep; 175;
4. Swaby RF, Cristofanilli M. Circulating tumor cells in breast cancer: a tool whose time has come of age. BMC Med. 2011 Apr 21;9:3. doi:10.1186/1741-7015-9-43. Review.
5. M.Kauner, Evaluation of the 70 gene signature for the prediction of prognosis of breast cancer independently from histologic grade. J.Clin. Oncol. 28:2010.
6. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-years survival: an overview of the randomized trials. *Lancet*. 2005;365:1687-1717.Nt4 Cp3)
7. Early Breast Cancer - Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Lancet*. 1998;352:930-942 Nt 5 Cp3).
8. Paget S. *The distribution of growth in cancer of breast*. *Lancet*. 1, 571-573. 1889.
9. S. Klingler, Using one-step nucleic acid amplification (OSNA) for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients avoids second surgery and accelerates initiation of adjuvant therapy – *Ann Oncol first published online May 9, 2013*.
10. EA Slodkowska, MammaPrint 70-gene signature: another milestone in personalized medical care for breast cancer patients. 2009 Jul;9(5):417-22.
11. Clinical validation of the endopredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER+/HER2- breast cancer pts: results from the GEICAM 9906 trial. Miquel Martin, et al. Breast Cancer Research, 2014.
12. The endopredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients. P. Dusky, et al. BJC, 2013 -109, 2959-2964.
13. Monica Morrow, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center "Personalizing extent of breast cancer surgery according to molecular subtypes" New York, NY 10065, USA The Breast 2013.
14. Rulli A, Listorti C, Foglietta J, Burattini M, Caracappa D, Palumbo I, Barberini F, Covarelli P, Boselli C. Minerva "Impact of genetic signature on breast cancer therapy: preliminary experience" Med. 2015 Oct;106(5):309-313.
15. St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer, 2015
16. 1st International Symposium "Treating today's patients with tomorrow's solutions" , Parigi, Maison des Oceans, 5-6 febbraio 2106
17. Il quadro epidemiologico per la programmazione della prevenzione oncologica regionale in Umbria. Gruppo di lavoro RTUP - IL NUOVO MODELLO ORGANIZZATIVO PER GLI SCREENING ONCOLOGICI DI POPOLAZIONE IN UMBRIA.
18. Rulli A., et alii , Nuove frontiere nella diagnosi e nel trattamento personalizzato del cancro della mammella: la firma genetica. Giornata Nazionale Ricerca LILT-11 marzo 2016-Roma
19. I tumori in Italia- AIRTUM 2011
20. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. Nat Rev Clin Oncol. 2013; 10(8):472-84.
21. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. J Clin Oncol. 2014; 32(6):579-86.
22. Douillard JY, et al. Gefitinib treatment in EGFR mutated Caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. J Thorac Oncol. 2014; 9(9):1345-53.

23. Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C, et al Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities. *Cancer Treat Rev.* 2014; 40(5):648-55.
24. Ilie M, Hofman V, Long E, Bordone O, et al. Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? *Ann Transl Med.* 2014; 2(11):107.
25. Lebofsky R, Decraene C, Bernard V, et al. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Mol Oncol.* 2015; 9(4):783-90
26. Analysis of tumor template from multiple compartments in a blood sample provides complementary access to peripheral tumor biomarkers William M. Strauss¹, Chris Carter¹, Jill Simmons¹, Erich Klem¹, Nathan Goodman², Behrad Vahidi¹, Juan Romero^{1,8}, Michael Masterman-Smith¹, Ruth O' Regan³, Keerthi Gogineni⁴, Lee Schwartzberg⁵, Laura K. Austin⁶, Paul W. Dempsey¹, Massimo Cristofanilli⁷. *Oncotarget*, 2016


Prof. Antonio Rulli

Perugia, lì 12 aprile 2016