

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN
TERAPIE AVANZATE BIOMEDICHE E CHIRURGICHE
XXXI CICLO**

***Analisi molecolare di cellule tumorali
circolanti in pazienti affette da carcinoma
mammario avanzato***

*Relatore
Chiar.mo Prof.
Pietro Forestieri*

*Candidato
Dott.ssa Viviana Sollazzo*

INTRODUZIONE.....4

CAPITOLO I

IL CARCINOMA MAMMARIO

1 Il Carcinoma Mammario.....4

 1.1 *Incidenza, Mortalità, Sopravvivenza*.....4

 1.2 *Aspetti istologici, morfologici, biomolecolari*.....6

 1.3 *Stadiazione*.....13

 1.4 *Cenni di Terapia*.....14

2 Carcinoma mammario metastatico e processo di metastatizzazione.....18

 2.1 *Eterogeneità tumorale*.....23

 2.1.1 *Origine dell’eterogeneità tumorale: ipotesi a confronto*.....24

 2.2 *Biopsia liquida*.....29

 2.2.1 *Vantaggi e limiti dell’utilizzo della biopsia liquida*.....30

 2.2.2 *Prospettive future della biopsia liquida*.....31

 2.3 *Cellule tumorali circolanti*.....33

 2.3.1 *Caratteristiche biologiche, significato e rilevanza clinica*.....35

 2.3.2 *Metodiche per l’isolamento delle CTC nel sangue periferico*.....35

 2.3.3 *Cellule tumorali circolanti nel carcinoma mammario*.....38

CAPITOLO II

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO

1 Ipotesi.....40

2 Obiettivi dello studio.....	41
-------------------------------	----

CAPITOLO III

PAZIENTI E METODI

2 Selezione delle pazienti.....	42
3 Materiali e metodi.....	43
4 2.1 <i>RosetteSep™ Kit</i>	44
2.2 <i>Controllo di qualità</i>	44
2.3 <i>Controlli preliminari richiesti</i>	45
2.4 <i>Procedura</i>	45

CAPITOLO IV

RISULTATI

1 Risultati.....	48
------------------	----

CAPITOLO V

DISCUSSIONE, CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

1 <i>Discussione</i>	55
2 <i>Conclusioni e prospettive future</i>	56

BIBLIOGRAFIA.....	58
--------------------------	-----------

Introduzione

CAPITOLO I

IL CARCINOMA MAMMARIO

SOMMARIO: 1. Il carcinoma mammario – 1.1 Incidenza, mortalità, sopravvivenza – 1.2 Aspetti istologici, morfologici, biomolecolari – 1.3 Stadiazione – 1.4 Cenni di terapia – 2. Carcinoma mammario metastatico e processo di metastatizzazione – 2.1 Eterogeneità tumorale – 2.2 Origine dell’eterogeneità tumorale: ipotesi a confronto – 2.2 Biopsia liquida – 2.2.1 Vantaggi e limiti dell’utilizzo della biopsia liquida – 2.2.2 Biopsia liquida: prospettive future – 2.3 Cellule tumorali circolanti – 2.3.1 Caratteristiche biologiche, significato e rilevanza clinica – 2.3.2 Metodiche per l’isolamento delle CTC nel sangue periferico – 2.3.3 Cellule tumorali circolanti nel carcinoma mammario

1. Il carcinoma mammario

1.1 Incidenza, mortalità, sopravvivenza

Il carcinoma mammario è la neoplasia più diagnosticata nel sesso femminile, rappresentando il 28% dei tumori maligni. Anche considerando le frequenze nelle varie fasce d’età, risulta essere il più diffuso (0-49 anni, 41%; 50-69 anni, 35%; +70 anni,

22%)¹. Si stima che 1 donna su 8 si ammalerà di carcinoma mammario nel corso della propria vita.

L'incidenza del tumore della mammella in Italia appare in leggero aumento (+0,9% per anno), mentre continua a calare la mortalità (-2,2% per anno).

La neoplasia possiede una notevole variabilità geografica, presentando tassi fino a 10 volte superiori nei Paesi economicamente avanzati. L'incidenza della patologia ha subito una significativa flessione intorno al Duemila: ad esempio, negli USA, a partire dal 2003 si è osservata un calo dell'incidenza di patologie neoplastiche ormono-responsive, correlata alla riduzione della prescrizione della terapia ormonale sostitutiva² dopo la pubblicazione dei risultati dello studio WHI³ (che evidenziavano un aumento dell'incidenza di tumori mammari invasivi e di malattie cardiovascolari in seguito all'uso della terapia ormonale sostitutiva in post-menopausa). In Italia, per via della minore diffusione della terapia ormonale sostitutiva, tale riduzione di incidenza è dovuta principalmente all'effetto di saturazione dell'incidenza determinata dai primi round dei programmi di screening mammografico⁴, introdotti nella seconda metà degli anni '90.

Le differenze tra macro-aree osservate nel periodo 2008-2013 esprimono la somma di diversi fattori: la disuguale diffusione dello screening mammografico sul territorio e la disomogeneità nella presenza dei fattori di rischio. Le osservazioni hanno infatti confermato una maggiore incidenza al Nord (162,2 casi/100.000 donne) rispetto al Centro (143,2 casi/100.000 donne) e al Sud-Isole (124,5 casi/100.000 donne). In Italia, il carcinoma mammario conta circa 50.000 nuovi casi l'anno e più di 12.000 decessi. Le differenze di mortalità osservate tra le diverse macro-aree italiane sono invece limitate (37,6 casi ogni 100.000 al Nord, 31,8 casi al Centro e 34,1 casi al Sud-Isole).

La sopravvivenza a 5 anni delle donne con carcinoma mammario in Italia è pari all'87%, senza spiccate differenze tra le varie fasce d'età (91% fra 15-44 anni, 92% fra 45-54 anni, 91% 55-64 anni, 89% fra 65-74 anni, 79% per le donne anziane 75+ anni).

1.2 Aspetti istologici, morfologici, biomolecolari

La classificazione istologica del carcinoma della mammella è quella derivata dalle linee guida WHO 2012⁵, prevedendo:

- Carcinoma duttale (70-80%);
- Carcinoma lobulare (10-15%);
- Carcinoma tubulare-cribriforme (6%);
- Carcinoma mucinoso (2%);
- Carcinoma midollare (2%);
- Carcinoma con differenziazione apocrina (<1%);
- Carcinoma infiltrante micropapillare (1%);
- Carcinoma apocrino (<1%);
- Carcinoma con differenziazione ad anello con castone (<1%);
- Carcinoma metaplastico di tipo non speciale (<1%).

Più del 95% dei carcinomi della mammella sono adenocarcinomi. L'istotipo più frequente è il carcinoma duttale, seguito dal carcinoma lobulare; entrambi presentano due forme:

- Carcinoma in situ: proliferazione di cellule neoplastiche limitata, dalla membrana basale, ai dotti e ai lobuli⁶. Costituiscono circa il 15-20% dei carcinomi della mammella. Nell'80% dei casi si tratta di un carcinoma duttale. Tali forme precoci vengono primariamente individuate dai programmi di prevenzione secondaria, che risulta essere cruciale: la diagnosi e il trattamento del carcinoma duttale in situ possono infatti prevenire l'insorgenza di un futuro carcinoma mammario invasivo. Uno studio britannico evidenzia come il 90% dei centri di screening mostri un caso in meno di carcinoma invasivo nei tre anni successivi per ogni tre casi di carcinoma duttale in situ rilevato alla mammografia⁷.

- Carcinoma invasivo: le cellule neoplastiche superano la membrana basale, invadendo lo stroma. Da questa localizzazione, le cellule maligne possono giungere ai linfonodi regionali e alle sedi a distanza.

Il carcinoma duttale infiltrante rappresenta il 70-80% di tutti gli istotipi. È caratterizzato da un'ingente quantità di stroma (fibroso o sclero-ialino), assumendo quindi una consistenza dura; viene infatti definito anche carcinoma scirroso. Le cellule neoplastiche formano isolotti solidi, cordoni grossolani e strutture tubulari. Inoltre, il termine carcinoma duttale infiltrante può essere seguito da una dicitura, "non altrimenti specificato" (NAS), per distinguerlo dagli istotipi più aggressivi.

Il carcinoma lobulare infiltrante rappresenta invece il 10-15% dei casi. Le cellule neoplastiche invadono lo stroma in filiere sottili, unicellulari (a fila indiana); frequentemente vanno a disporsi in maniera concentrica intorno alle strutture duttali o lobulari. Tale istotipo è multifocale e bilaterale, più spesso rispetto al carcinoma duttale infiltrante.

La sopravvivenza a 30 anni nelle donne con carcinomi invasivi degli istotipi tubulare, mucinoso, midollare, lobulare e papillare è superiore al 60%. Questa scende a meno del 20% nelle donne con carcinomi di altri rari istotipi. Per questo motivo, si può affermare che il tipo istologico rappresenta un fattore prognostico importante.

Oltre al tipo istologico, si definisce anche il grading. Nel carcinoma mammario, il sistema di attribuzione del grading più utilizzato è il Nottingham Histologic Score⁸, che prende in esame il grado nucleare, la formazione di tubuli e l'indice mitotico classificando i tumori in tre classi, correlate alla sopravvivenza⁹.

- G1: ben differenziati, 20% circa del totale. La sopravvivenza diminuisce gradualmente al 70% a 24 anni.
- G2: moderatamente differenziati, 35% circa del totale. Possiedono una maggiore sopravvivenza nelle fasi iniziali, ma soltanto leggermente superiore ai G3 nel lungo termine.

- G3: poco differenziati, 46% circa del totale. Il decesso avviene nella maggior parte dei casi nel primo decennio e il 45% delle pazienti sopravvive a lungo termine.

La sopravvivenza decrescente dipende dal rischio di recidiva tumorale che va aumentando nei tre gradi. Di conseguenza, anche il grading tumorale è un fattore prognostico.

Dal punto di vista recettoriale, esistono ulteriori differenze fra i vari istotipi di carcinoma mammario. Le indagini di immunohistochemica consentono di dimostrare la presenza/assenza di tre recettori¹⁰:

- ER α (Estrogen Receptor α), il recettore per gli estrogeni;
- PgR (Progesteron Receptor), il recettore per il progesterone;
- HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2), il recettore per il fattore di crescita dell'epidermide.

Il recettore per gli estrogeni (ER) è un recettore intracellulare. Appartiene alla superfamiglia dei recettori nucleari dei fattori di trascrizione. Esistono due isoforme recettoriali: ER α ¹¹ (PM 66 kDa) e ER β (PM 56 kDa). Questi recettori possiedono una struttura proteica conservata costituita da cinque domini:

- I. Regione ammino-terminale (A/B domain): è quella meno conservata; contiene AF-1 (Activation Function 1), che innesca la trascrizione genica ligando-indipendente.
- II. Dominio C: il più conservato; dominio di legame al DNA (DNA Binding Domain, DBD).
- III. Dominio D: regione di collegamento ("hinge", cerniera) fra dominio C e dominio E; può contenere, inoltre, sequenze di localizzazione nucleare (Nuclear Localization Signal, NLS).
- IV. Dominio E: dominio di legame del ligando (Ligand Binding Domain, LBD), dove è localizzato il dominio AF-2 (Activation Function 2) responsabile della trascrizione ligando-dipendente; dominio per la dimerizzazione recettoriale.

- V. Regione carbossi-terminale F: poco conservata. Presente solo in alcuni recettori nucleari, tra cui entrambe le isoforme degli ER¹²⁻¹³.

Dopo che l'ormone ha legato il recettore, questo dimerizza e migra dal citoplasma al nucleo. In questa sede, si lega a particolari sequenze del DNA denominate "estrogen response elements" (ERE), innescando gli effetti genomici¹² grazie alla modulazione di specifici promotori genici. I due recettori sono infatti in grado di reclutare coattivatori e corepressori, regolando in tal modo l'attività trascrizionale.

Il recettore per il progesterone (PgR) possiede due isoforme: il recettore A (PM 82 kDa) e il recettore B (PM 116 kDa). Le due proteine derivano da un unico gene e sono identiche, tranne che per una porzione di 164 amminoacidi N-terminali nel recettore B. Entrambe le isoforme sono così strutturate:

- I. Regione C-terminale: dominio legante l'ormone (HBD).
- II. Regione centrale: dominio legante il DNA (DBD). È separato dal precedente da una breve sequenza di localizzazione nucleare e da una regione cerniera.
- III. Regione N-terminale: dominio di 91 amminoacidi con funzione di attività transattivante (AF-1). Il recettore B contiene un ulteriore dominio transattivante (AF-3).

Nonostante la somiglianza strutturale, le due isoforme possiedono funzioni diverse: infatti, alcuni antiprogestini sono agonisti parziali sui recettori B, mentre non hanno attività sui recettori A¹⁴.

HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 o c-erbB2 o neu) è una glicoproteina di membrana trascritta a partire da un gene localizzato sul cromosoma 17, la cui aumentata espressione è associata all'insorgenza e alla progressione delle neoplasie¹⁵. Tale recettore fa parte della famiglia degli RTK (recettori tirosino-kinasi) di tipo 1. Esso è in grado di creare etero-oligomeri con gli altri membri della famiglia RTK (HER-1, HER-3 e HER-4) in risposta alle neuregoline/heregoline. In risposta a tali specifici ligandi, l'attività chinasi di HER-2/neu aumenta e porta alla trasduzione del

segnale, con conseguente proliferazione o differenziazione cellulare e, a seconda del contesto in cui avviene, con attivazione di entrambi i meccanismi.

Fisiologicamente, HER-2 funge da recettore per alcuni fattori di crescita presenti in circolo, che regolano la crescita e il differenziamento cellulare.

Nel momento in cui il gene che codifica per HER-2 è amplificato, la quantità eccessiva della proteina può condurre alla proliferazione neoplastica e alla conseguente insorgenza del carcinoma¹⁶. Nel 20-30% dei carcinomi mammari

è presente una sovraespressione/amplificazione del gene HER-2, presente generalmente sin dalle prime fasi della patologia. Nel 90% dei casi, ciò è dovuto

a un'amplificazione del gene sul cromosoma 17q21, verificabile sia tramite immunohistochimica (che valuta il contenuto proteico) sia tramite tecnica FISH¹⁷ (che invece valuta il numero di copie del gene). Una valida alternativa all'utilizzo della FISH è rappresentata dalla Dual-ISH¹⁸. Circa la metà dei carcinomi positivi per HER-2, presenta positività anche per il recettore ormonale (tumori "co-positivi").

La positività al recettore HER-2 è un fattore prognostico negativo, con prognosi infausta e tempi di recidiva più veloci in tutti gli stadi di malattia. L'avvento della terapia con anticorpi monoclonali diretti selettivamente verso le cellule neoplastiche che esprimono HER-2, senza colpire quelle sane, ha tuttavia rivoluzionato la terapia del carcinoma mammario¹⁹.

Negli ultimi anni, grazie a indagini di biologia molecolare, è stato possibile identificare quattro sottotipi di carcinoma mammario invasivo²⁰:

- Luminale A
- Luminale B
- Carcinoma mammario HER-2+
- Basal-like

Tali sottotipi possiedono prognosi ed opportunità terapeutiche differenti²¹. Essi rispecchiano i pattern di espressione genica relativa ai due gruppi principali di cellule

nella mammella adulta: le *cellule luminali*, un epitelio monostrato rivolto verso il lume dei tubuli, e le *cellule mioepiteliali*, che sono di pertinenza della membrana basale e circondano le precedenti. Nella pratica clinica, la valutazione immunohistochimica dei recettori ormonali, del Ki67 e di HER-2 permette di identificare quattro gruppi fenotipici che presentano una corrispondenza con i quattro sottotipi identificati sulla base dell'espressione genica²².

I carcinomi luminali rappresentano il 70% circa dei carcinomi mammari invasivi ed esprimono le citocheratine luminali (CK8 e CK18). Inoltre, sono positivi ai recettori degli estrogeni (ER) e del progesterone (PgR). Riconosciamo:

- Luminale A: recettori ormonali positivi (estrogenici/progestinici), HER-2 negativo e bassa attività di proliferazione cellulare (basso Ki67). Prognosi migliore²³.
- Luminale B²²: si distinguono due sottotipi, il Luminale B/HER-2 negativo (recettori ormonali positivi, HER-2 negativo e alta attività proliferativa) e il Luminale B/HER-2 positivo (recettori ormonali positivi, HER-2 sovraespresso/amplificato, con qualsiasi attività proliferativa).²⁴

I carcinomi HER-2+ (non luminali) rappresentano il 10-15% dei carcinomi mammari invasivi e possiedono HER-2 sovraespresso/amplificato e altri geni (GRB7 E GATA4). Entrambi i recettori ormonali sono negativi. A causa di tale profilo molecolare, sono carcinomi ad alto grado, frequentemente linfonodo-positivi.

I carcinomi basal-like (chiamati anche basali, basalioidi o carcinomi a fenotipo basale) rappresentano il 10-20% dei carcinomi mammari invasivi. Tali neoplasie non esprimono recettori ormonali e sono HER-2 negative; tuttavia risultano positive per le citocheratine (mioepiteliali) basali (CK5, CK6 e CK17), P-caderina, p63 o laminina. In circa l'80% dei casi, i carcinomi basal-like sono sovrapponibili ai carcinomi "*tripli negativi*" individuati dalle tecniche di immunohistochimica. Alcuni carcinomi presenti in questa classe esprimono markers staminali e bassi livelli di claudine ("*claudin-low*") e possiedono cattiva prognosi²⁵⁻²⁶.

I carcinomi tripli negativi sono più frequenti in giovane età, nelle donne di origine africana e nelle donne obese. Inoltre, sono associati ai geni BRCA-1 e BRCA-2²⁷, che regolano la suscettibilità all'insorgenza del carcinoma mammario, e presentano alterazioni dell'espressione di proteine, oncogeni ed oncosoppressori coinvolti in diverse vie di trasduzione del segnale (proliferazione, crescita, apoptosi). Le neoplasie generate dalle cellule dotate di questo assetto molecolare sono scarsamente differenziate, altamente maligne e molto aggressive, caratterizzate da prognosi infausta e da un alto rischio di sviluppare metastasi a distanza (fegato, sistema nervoso centrale e polmone).

Dal punto di vista morfologico, i carcinomi tripli negativi possiedono caratteristiche peculiari: elevato indice mitotico, necrosi tumorale, risposta linfocitaria stromale ed aumentato rapporto nucleo/citoplasma.

Dal punto di vista istologico, tali neoplasie sono, in genere, carcinomi duttali invasivi di alto grado (G3); più raramente, carcinomi metaplastici o midollari.

Il trattamento dei carcinomi tripli negativi si basa sulla chemioterapia, dal momento che l'assenza di espressione dei recettori ER, PgR e HER-2²⁸ lo rende non responsivo alle terapie ormonali o basate sull'utilizzo degli anticorpi monoclonali diretti contro HER-2. Nonostante la risposta alla chemioterapia, questi tipi di tumori presentano un alto rischio di recidiva in pazienti con e senza malattia residua.

1.3 Stadiazione

La stadiazione del carcinoma mammario prevede, da gennaio 2010, l'utilizzo del sistema di classificazione TNM rivisto dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC-settima edizione)²⁹.

<p>Tx: tumore primitivo non definibile T0: non evidenza del tumore primitivo Tis: carcinoma in situ: Tis (DCIS) Carcinoma duttale in situ Tis (LCIS) Carcinoma lobulare in situ Tis (Paget) Malattia di Paget del capezzolo non associata con carcinoma invasivo e/o in situ nel parenchima mammario sottostante⁽¹⁾ T1: tumore della dimensione massima fino a 2 cm T1mi: microinvasione della dimensione massima di 0,1 cm T1a: tumore dalla dimensione compresa tra 0,1 cm e 0,5 cm T1b: tumore dalla dimensione compresa tra 0,6 cm e 1,0 cm T1c: tumore dalla dimensione compresa tra 1,1 cm e 2,0 cm T2: tumore superiore a 2,0 cm ma non superiore a 5,0 cm nella dimensione massima T3: tumore superiore a 5,0 cm nella dimensione massima T4: tumore di qualsiasi dimensione con estensione diretta alla parete toracica e/o alla cute (ulcerazione o noduli cutanei)⁽²⁾ T4a: estensione alla parete toracica (esclusa la sola aderenza/invasione del muscolo pettorale) T4b: Ulcerazione della cute e/o noduli cutanei satelliti ipsilaterali e/o edema della cute (inclusa cute a buccia d'arancia) che non presenta i criteri per definire il carcinoma infiammatorio T4c: presenza contemporanea delle caratteristiche di T4a e T4b T4d: carcinoma infiammatorio⁽³⁾ Linfonodi regionali (N): Nx: linfonodi regionali non valutabili (ad esempio, se precedentemente asportati) N0: linfonodi regionali liberi da metastasi N1: metastasi nei linfonodi ascellari omolaterali mobili (livello I-II) N2: metastasi nei linfonodi ascellari omolaterali (livello I-II) che sono clinicamente fissi o fissi tra di loro; o in linfonodi mammari interni omolaterali clinicamente rilevabili⁽⁴⁾ in assenza di metastasi clinicamente evidenti nei linfonodi ascellari N2a: metastasi nei linfonodi ascellari omolaterali (livello I-II) fissi tra di loro o ad altre strutture N2b: metastasi solamente nei linfonodi mammari interni omolaterali clinicamente rilevabili⁽⁴⁾ e in assenza di metastasi clinicamente evidenti nei linfonodi ascellari (livello I-II) N3: metastasi in uno o più linfonodi sottoclaveari omolaterali (livello III ascellare) con o senza coinvolgimento di linfonodi ascellari del livello I, II; o nei linfonodi mammari interni omolaterali clinicamente rilevabili⁽⁴⁾ in presenza di metastasi nei linfonodi ascellari livello I-II clinicamente evidenti; o metastasi in uno o più linfonodi sovraclaveari omolaterali con o senza coinvolgimento dei linfonodi ascellari o mammari interni N3a: metastasi nei linfonodi sottoclaveari omolaterali N3b: metastasi nei linfonodi mammari interni e ascellari N3c: metastasi nei linfonodi sovraclaveari Metastasi a distanza (M): Mx: metastasi a distanza non accertabili M0: non evidenza clinica o radiologica di metastasi a distanza cM0(i+): non evidenza clinica o radiologica di metastasi a distanza, ma depositi di cellule tumorali evidenziati mediante biologia molecolare o microscopicamente nel sangue, midollo osseo o in altri tessuti diversi dai linfonodi regionali, di dimensioni non superiori a 0,2 mm in una paziente senza segni o sintomi di metastasi M1: metastasi a distanza evidenziate mediante classici esami clinico e radiologico e/o istologicamente dimostrate di dimensioni superiori a 0,2 mm.</p>

Tabella 1: Classificazione AJCC 2009 (settima edizione)²⁹

Stadio 0	Tis	N0			M0
Stadio I A	T1	N0			M0
Stadio I B	T0 T1	N1 mi N1 mi			
Stadio IIA	T0 T1 T2	N1 N1 N0			M0
Stadio IIB	T2 T3	N1 N0			M0
Stadio IIIA	T0 T1 T2 T3 T3	N2 N2 N2 N1 N2			M0
Stadio IIIB	T4 T4 T4	N0 N1 N2			M0
Stadio IIIC	Ogni T	N3			M0
Stadio IV	Ogni T	Ogni N			M1

Tabella 2: Classificazione in stadi del carcinoma mammario (AJCC 2009)²⁹

1.4 Cenni di terapia

Il trattamento del carcinoma mammario prevede molteplici approcci. La metodica più adatta viene scelta sulla base di differenti fattori:

- Quadro clinico (malattia in situ, locale, localmente avanzata, metastatica);
- Quadro biomolecolare (positività ai recettori ormonali, iperespressione HER-2);
- Modalità terapeutica (trattamento neoadiuvante, adiuvante, avanzato);
- Tipologia di terapia (terapia ormonale, terapia biologica, chemioterapia).

Il carcinoma mammario viene considerato sin dalla diagnosi come una patologia neoplastica “micrometastatica”. I protocolli terapeutici sono cambiati nettamente durante gli ultimi decenni. Dal punto di vista chirurgico, si è passati da interventi localmente

aggressivi (es. mastectomia radicale di Halsted e modificata) a trattamenti conservativi (QUART: quadrantectomia + radioterapia)³⁰. Dal punto di vista medico, è possibile effettuare sia la terapia neoadiuvante, un trattamento pre-chirurgico atto a rendere operabile la lesione, sia la terapia adiuvante, che elimina le cellule neoplastiche precedentemente migrate in circolo. Quest'ultima risulta la più diffusa ed è stata concepita sulla base dell'evidenza che oltre il 50% delle pazienti affette da carcinoma allo stadio TNM I-II subisce una ricaduta con malattia sistemica, causata dalle micrometastasi occulte alla diagnosi, dopo un variabile intervallo libero da malattia.

La terapia medica può prevedere differenti approcci: la chemioterapia citotossica, la terapia ormonale e la terapia biologica (anti-HER2).

La chemioterapia citotossica colpisce prevalentemente le cellule con un elevato indice di proliferazione, misurabile tramite immunoistochimica con la determinazione del Ki67. Tuttavia, la presenza di cellule in continua replicazione è una caratteristica comune a molti tessuti normali del nostro organismo: questa terapia presenta infatti un'azione lesiva anche nei confronti di tali tessuti ad elevato turnover cellulare (mucose del tubo digerente e midollo osseo principalmente). Le classi di farmaci più frequentemente utilizzate nel trattamento del carcinoma della mammella sono rappresentate dai taxani e dalle antracicline, impiegate sia in regimi di mono- che poli-chemioterapia di terza generazione.

- Doxorubicina: appartiene alla classe delle antracicline (antibiotici antitumorali), che agiscono producendo dei tagli nel DNA mediante la produzione di radicali liberi e l'interazione con la topoisomerasi II. Inoltre, possiedono un'azione intercalante tra le catene del DNA. Le associazioni che comprendono la doxorubicina risultano in una migliore risposta, tempo alla progressione e sopravvivenza globale, come dimostrato in un'ampia metanalisi di studi randomizzati. Tuttavia, il farmaco impone un'attenta valutazione della funzionalità cardiovascolare, dal momento che è caratterizzato da una spiccata cardiotossicità.

- 4'-Epi-Doxorubicina: analogo dotato di minore cardiotossicità.
- Doxorubicina liposomiale³¹: il farmaco risulta incorporato in liposomi, che ne riducono la cardiotossicità pur preservando analoga attività antitumorale³².
- Docetaxel e Paclitaxel: appartengono alla classe dei taxani, che agiscono legandosi alla β -tubulina dei microtubuli del fuso mitotico e stabilizzandoli. Gli effetti collaterali di tali farmaci sono più frequentemente neutropenia e neurotossicità. Non sviluppano fenomeni di cross-resistenza con le antracicline, per questo motivo rappresentano una valida alternativa terapeutica. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che i taxani possiedono attività antitumorale comparabile o superiore alle antracicline³³.

La terapia ormonale viene utilizzata esclusivamente nei confronti di neoplasie caratterizzate da positività dei recettori ormonali. Le opzioni terapeutiche sono:

- SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators): agiscono sui recettori degli estrogeni in maniera diversa a seconda del tessuto considerato. A livello mammario, viene principalmente utilizzato il Tamoxifene, che agisce da anti-estrogeno. È un agente non-steroidale che inibisce competitivamente il recettore ER, inducendo un cambiamento conformazionale che ne reprime l'attività trascrizionale. Il farmaco viene somministrato in premenopausa per 5 anni, associato ad analoghi dell'LHRH per bloccare la funzione ovarica³⁴⁻³⁵⁻³⁶. In alternativa, esiste uno schema che prevede Tamoxifene per 2-3 anni seguito da inibitore dell'aromatasi per 3-2 anni.
- Inibitori dell'Aromatasi (anastrozolo³⁷⁻³⁸ e letrozolo³⁹): agiscono inibendo l'enzima aromatasi, responsabile della conversione periferica degli androgeni in estrogeni. Essi vengono primariamente utilizzati per il trattamento del carcinoma mammario in post-menopausa.
- SERD (Selective Estrogen Receptor Degradator): agiscono legando i recettori degli estrogeni e indirizzandoli alla degradazione (con conseguente down-regolazione). Il capostipite di questa classe è il Fulvestrant⁴⁰.

Dai risultati provenienti da due importanti trial clinici, il BIG 1-98⁴¹ (Breast International Group) e l'ATAC⁴² (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination Trial), che mettono a confronto il Tamoxifene con gli inibitori delle aromatasi, è possibile desumere che un trattamento della durata di 5 anni con gli inibitori delle aromatasi porta ad un aumento della sopravvivenza libera da malattia rispetto al trattamento della stessa durata con Tamoxifene.

La terapia biologica (anti-HER-2) viene utilizzata nel trattamento dei carcinomi che sovraesprimono/amplificano HER-2, individuati tramite le tecniche di immunistochemiche o tramite FISH. Il farmaco capostipite è il Trastuzumab, un anticorpo monoclonale umanizzato che ha come bersaglio il recettore HER-2⁴³. Il farmaco ha dimostrato di avere una notevole efficacia nel trattamento dei carcinomi mammari, sia negli stadi iniziali che nella malattia metastatica⁴⁴⁻⁴⁵. Il suo utilizzo si associa infatti a un aumento delle percentuali di risposta, della sopravvivenza libera da malattia, della sopravvivenza globale e della qualità della vita; ciò vale nei regimi di monoterapia e in combinazione. Altri farmaci appartenenti a questa classe sono il Lapatinib (agisce sull'attività tirosin-chinasica dell'EGFR e dell'HER-2) e il Pertuzumab (si lega ad un epitopo differente da quello del Trastuzumab). L'efficacia di quest'ultimo è notevole in combinazione con docetaxel e trastuzumab (studio CLEOPATRA⁴⁶).

2. Carcinoma mammario metastatico e processo di metastatizzazione

Il processo di metastatizzazione consiste nella disseminazione delle cellule neoplastiche derivanti dal tumore primitivo in nuove sedi tumorali a distanza. In tali localizzazioni, la cellula è in grado di moltiplicarsi andando a formare una nuova popolazione neoplastica; il processo è strettamente dipendente dalle condizioni del microambiente e dalle caratteristiche della cellula iniziante. La disseminazione metastatica può avvenire per via linfatica, ematica, per contiguità o per colonizzazione di cavità.

Nel momento in cui un carcinoma riesce a superare la membrana basale (con la transizione da carcinoma in situ a invasivo), inizia il processo metastatico. La cellula neoplastica riesce a penetrare nello stroma sottostante la membrana basale grazie a diversi enzimi (metalloproteasi, u-PA receptor). Una volta distaccatasi dal tumore primitivo, la cellula può in questo modo penetrare nei vasi (intravasazione). A questo punto, essa può arrestarsi a breve distanza dal tumore primario (nel medesimo organo) oppure circolare sopravvivendo nei vasi ematici o linfatici, aderendo in un sito a distanza (*homing*), fuoriuscendo dai vasi (extravasazione) e dando luogo a quei processi di proliferazione e neoangiogenesi che porteranno alla formazione della metastasi. L'ambiente da colonizzare è spesso ostile per la cellula tumorale e si ritiene che meno dello 0,01% delle cellule tumorali circolanti riesca a sviluppare una metastasi. Il successo dipende in larga parte dalla cosiddetta compatibilità *seed-soil*, ovvero la cellula neoplastica deve trovare un "terreno fertile" per proliferare, rappresentato dal microambiente tissutale.

La disseminazione metastatica sembra essere prerogativa di un ristretto gruppo di cellule, le CST (cellule staminali tumorali). In particolare, una precisa sottopopolazione di queste cellule (mCST, cellule staminali tumorali migratorie) sembra essere in grado di migrare dalla lesione primaria e colonizzare localizzazioni a distanza⁴⁷. Ciò è dovuto alla loro elevata plasticità, capacità di trans-differenziare e di movimento. Tali cellule sono in grado di generare micro-metastasi, ricche di cellule staminali, e macro-metastasi, che spesso

somigliano al tumore primitivo per quanto riguarda la composizione cellulare e l'eterogenicità⁴⁸.

Non si è ancora compreso a pieno perché questa popolazione possiede tale propensione all'invasione, ma esistono alcune spiegazioni. Le mCST si trovano nella regione periferica dei tumori, al confine con il tessuto circostante normale. Inoltre, possono eseguire la transizione epitelio-mesenchima (EMT). La EMT e il suo inverso (MET, Mesenchymal-Epithelial Transition) fisiologicamente rappresentano processi fondamentali nella riparazione/rigenerazione di tessuti danneggiati e nell'embriogenesi⁴⁹⁻⁵⁰, quando si sviluppano cellule con elevata capacità di movimento che migrano e generano tessuti diversi.

Nella disseminazione metastatica, la EMT risulta deregolata e consente alle mCST di migrare a distanza raggiungendo localizzazioni secondarie, associandosi spesso a specifici stadi (invasione e intravasazione)⁵¹ della progressione tumorale.

La EMT è caratterizzata da processi particolari:

- Depolarizzazione delle cellule epiteliali, con perdita delle adesioni cellula-cellula (caderine e occludine) e cellula-matrice (integrine). Tale evento consente il distacco e la disseminazione delle cellule in circolo.
- Rimodellamento del citoscheletro cellulare, con aumento della mobilità della cellula⁵¹.
- Cambiamento del programma trascrizionale: attivazione di repressori dell'E-Caderina, sia diretti (Snail, SIP-1, TCF-3, KLF8) sia indiretti (Twist, Goosecoid e NFkB)⁵². Tali modifiche trascrizionale si ritrovano in diversi tumori umani, incluso il carcinoma mammario, dove correlano ad una maggiore aggressività/ricorrenza del tumore e prognosi più infausta⁵³.

Fenomeno del "cadherin switching"⁵⁴, con abbassamento dell'espressione dell'E-Caderina e concomitante aumento dell'N-Caderina (caderina mesenchimale). Si assisterà ad un aumento di marker mesenchimali e riduzione di marker epiteliali: aumento dell' α -actina del muscolo liscio (SMA) e della Vimentina, e riduzione delle

citocheratine epiteliali (CK18). In particolare, la misurazione dei livelli di Vimentina è stata utilizzata nel nostro studio come indicatore dell'avvenuta transizione epitelio mesenchimale delle cellule esaminate.

- Essa è indotta da molteplici stimoli provenienti dal microambiente tumorale, come l'ipossia, la matrice extracellulare (collagene e acido ialuronico) e diversi fattori solubili (HGF, RGT, Wnt, TGF- β , Hedgehog e varie citochine)⁵⁵.

Lo studio dei processi di metastatizzazione è iniziato negli anni '70; il modello più accettato per un lungo periodo è stato quello "classico"⁵⁶, il quale prevede che le cellule metastatiche siano solo una minima parte rispetto a quelle del tumore primitivo e che la metastasi sia una prerogativa degli stadi più avanzati della neoplasia. Tuttavia, il modello classico è stato messo in discussione in seguito a studi di espressione genica condotti su alcuni tumori⁵⁷. A proposito del carcinoma mammario si sono infatti constatate tali evidenze:

- Il 20-30% delle pazienti presenta metastasi a distanza in assenza di metastasi linfonodali precedenti⁵⁸.
- Un profilo genico potenzialmente metastatico è comune alla maggior parte delle cellule, se non a tutte, già all'inizio della patologia⁵⁹.
- La disseminazione linfatica ed ematica possiedono meccanismi di segnalazione/trasduzione differenti⁶⁰.
- La disseminazione sembra essere un evento molto precoce nella genesi del tumore.

Queste scoperte hanno condotto allo sviluppo di nuovi modelli della cascata metastatica.

Il primo modello descritto prevede il distacco delle cellule neoplastiche dal tumore primitivo nei primi stadi della patologia, raggiungendo in tal modo i linfonodi regionali o il circolo sistemico. Tuttavia, il destino delle cellule cambia a seconda della sede raggiunta: quelle nei linfonodi sarebbero in grado di proliferare dando origine a metastasi solide, mentre quelle in circolo morirebbero o rimarrebbero dormienti. Successivamente,

man mano che la patologia avanza, le cellule delle metastasi linfonodali sarebbero in grado di invadere altri organi e apparati, formando metastasi a distanza. Secondo questo modello, le metastasi a distanza possono avvenire soltanto in presenza di metastasi linfonodali già presenti: le cellule in grado di dare origine alle metastasi a distanza verrebbero così selezionate all'interno dei linfonodi, altrimenti non sarebbero in grado di sopravvivere in circolo.

Il secondo modello, invece, non prevede il passaggio obbligato all'interno dei linfonodi regionali. Le cellule neoplastiche sarebbero in grado di penetrare nel circolo sistemico con elevata frequenza, raggiungendo precocemente altre localizzazioni. Tale modello spiegherebbe l'esistenza di pazienti in cui, pur in assenza di foci neoplastici a livello linfonodale, si riscontrano metastasi a distanza.

Entrambi i modelli prevedono una seconda fase di disseminazione neoplastica derivante dalle metastasi, linfonodali o a distanza, precedentemente formatesi.

Alla luce di tali modelli di disseminazione metastatica e di diversi studi di espressione genica, risulta opportuno considerare il carcinoma mammario come una malattia sistemica sin dal suo esordio⁶¹.

Carcinoma mammario metastatico

Il carcinoma mammario si presenta come malattia metastatica all'esordio solo nel 7% delle pazienti. Infatti, nella maggior parte dei casi, lo sviluppo di metastasi è diagnosticato in pazienti con pregresso carcinoma mammario. Il rischio di recidiva risulta correlato a:

- Lo stato linfonodale: il 30% delle pazienti N- e il 70% di quelle N+ presentano una ripresa di malattia a 10 anni.
- Sottotipo biologico⁶²⁻⁶³: esso può, inoltre, influenzare la sede di recidiva, con una preferenza per il tessuto osseo nelle neoplasie ormonosensibili e per il tessuto cerebrale nei carcinomi HER-2+ e nei basal-like/triplo negativi.

La recidiva di malattia necessita di una ristadiazione, al fine di documentare il numero e le caratteristiche delle nuove lesioni, oltre ad eventuali modificazioni delle precedenti. Ciò

risulta particolarmente importante nei tumori HER-2+, gravati da un elevato rischio di metastatizzazione cerebrale occulta⁶⁴ (fino al 20% dei casi). L'utilizzo della biopsia della lesione metastatica durante la ristadiatura ha consentito di individuare una variazione dello stato recettoriale delle metastasi rispetto al tumore primitivo; ciò avviene in una percentuale di casi pari al 30% per i recettori ormonali e al 6% per il recettore HER-2⁶⁵, e la variazione può essere sia in positivo sia in negativo (da positivi a negativi e viceversa). Tale evidenza risulta confermata anche dal nostro studio. In circa il 15% dei casi, la determinazione della variazione recettoriale comporta modifiche terapeutiche, la cui utilità, tuttavia, non è stata ancora analizzata.

La decisione di effettuare una biopsia della lesione metastatica deve considerare diversi fattori:

1. La storia naturale della malattia: verificare che i tempi e il tipo di presentazione della metastasi sia compatibile con le caratteristiche biologiche del tumore primitivo.
2. Le caratteristiche biologiche del tumore primitivo, il trattamento intrapreso e la sensibilità ad esso.
3. La sede della lesione metastatica da studiare e la relativa facilità d'accesso per l'acquisizione del campione.
4. Le condizioni cliniche generali della paziente.

Allo scopo di definire i possibili obiettivi della terapia della malattia metastatica e di scegliere il trattamento più adeguato (ormonoterapia o chemioterapia)⁶⁶, bisogna considerare alcune caratteristiche cliniche e biologiche della neoplasia: lo stato recettoriale, l'attività proliferativa, l'intervallo libero da malattia, il numero e la sede delle metastasi. Esse permettono di definire l'aggressività della patologia e di predire la risposta al trattamento. Le metastasi si localizzano più frequentemente a livello dei tessuti molli (linfonodi e cute), dell'osso, del polmone e del fegato.

La chemioterapia⁶⁷ deve essere utilizzata in tutte le pazienti con malattia aggressiva, cioè in presenza di un breve intervallo libero da malattia (comparsa di metastasi durante il trattamento adiuvante o entro 12 mesi dal termine), crisi viscerale, compromissione d'organo e presenza di un elevato numero di metastasi viscerali (anche al sistema nervoso centrale). Un'altra indicazione all'utilizzo della chemioterapia è rappresentata dalla negatività dei recettori ormonali.

L'ormonoterapia deve essere considerata di elezione nelle neoplasie con localizzazioni esclusivamente ossee o ai tessuti molli, con lungo intervallo libero da malattia e, naturalmente, con recettori ormonali positivi.

Il trattamento con ormonoterapia e/o chemioterapia è in grado di prolungare la sopravvivenza, indurre la regressione tumorale, ridurre i sintomi e migliorare la qualità della vita⁶⁸. Tuttavia, il carcinoma mammario metastatico non consente un trattamento con finalità di guarigione. Nonostante le risposte siano di breve durata, la sopravvivenza mediana è relativamente lunga (24-36 mesi). L'utilizzo in successione di diverse linee terapeutiche con farmaci differenti porta a risultati migliori, anche se la progressione della malattia riduce la durata della risposta e le probabilità di regressione.

2.1 Eterogeneità tumorale

Il carcinoma mammario non è una singola malattia, bensì un gruppo eterogeneo di patologie estremamente differenti sul piano morfologico, prognostico e terapeutico. I primi sforzi per studiare l'eterogeneità tumorale furono illustrati da Foulds⁶⁹, negli anni '50.

L'eterogeneità tumorale, in passato, in assenza di tecniche in grado di studiare il DNA, è stata studiata soltanto in base ad alcune caratteristiche: la morfologia cellulare, l'istologia tissutale, i marker cariotipici e citogenetici, gli indici di proliferazione cellulare, l'analisi quantitativa dei prodotti cellulari (recettori ed enzimi), le caratteristiche immunologiche, la capacità metastatica e la sensibilità ai farmaci⁷⁰.

Da questi studi era già possibile comprendere come l'eterogeneità fosse una caratteristica intrinseca del processo tumorale. L'intenzione degli studiosi era quella di mettere in relazione l'eterogeneità fenotipica con quella genetica. La scoperta della regolazione epigenetica della trascrizione e dell'espressione genica rigenerò l'entusiasmo per la ricerca di nuove teorie sull'eterogeneità tumorale (come l'ipometilazione delle sequenze promotrici⁷¹).

Infine, si giunse alla conclusione che dal punto di vista genetico e molecolare le cellule neoplastiche non subissero cambiamenti marcati. La particolarità stava nel cambiamento dell'attività funzionale di suddette componenti, in risposta o come conseguenza di determinati fattori interni o esterni alla cellula. Esempio emblematico di tale disregolazione è rappresentato dall'alterazione o dal disaccoppiamento dei processi differenziativi e apoptotici delle cellule neoplastiche. Normalmente, il differenziamento cellulare porta una cellula a svilupparsi completamente, senza più effettuare la replicazione. Tuttavia, una cellula esposta a determinati fattori carcinogenetici può perdere il controllo di tale processo, continuando a dividersi in maniera perpetua senza mai effettuare il differenziamento. La cellula neoplastica presenta, quindi, un'attivazione costitutiva dei geni responsabili della proliferazione cellulare, a causa di un'alterata espressione dei geni responsabili del differenziamento.

Allo stesso tempo, altri studiosi spostarono la ricerca verso l'identificazione di altre cause non genetiche responsabili dell'eterogeneità tumorale. Fra queste si annoverano fattori infettivi, cellule staminali tumorali, errori o stress metabolici o ossidativi, aneuploidia, infiammazione, immunodeficienza, funzioni specifiche dei micro-RNA.

2.1.1 Origine dell'eterogeneità tumorale: ipotesi a confronto

Il crescente apprendimento di nuove informazioni sulla biologia dei tumori ha portato nel tempo a importanti cambiamenti delle teorie riguardanti la tumorigenesi. Ancora oggi, si ritiene tuttavia che la neoplasia origini da una singola cellula che acquisisce alterazioni multiple. Tali alterazioni sono rappresentate da mutazioni genetiche o cambiamenti epigenetici che conducono all'attivazione/sovraespressione di geni

promuoventi la proliferazione (oncogeni) e al silenziamento dei geni inibenti quest'ultima (geni tumor suppressor).

Il modello dell'evoluzione clonale descritto da Nowell nel 1976⁷² prevede che ogni cellula dell'organismo potrebbe essere oggetto di trasformazione maligna e acquisire le alterazioni del controllo della proliferazione. Tuttavia, sulla base di questo concetto di tumorigenesi, non è possibile spiegare la resistenza nei confronti di alcuni trattamenti atti ad eliminare le cellule proliferanti.

Di conseguenza, sono stati proposti nuovi modelli per spiegare la genesi dei tumori. Il modello più condiviso prevede l'esistenza di alterazioni geniche/epigenetiche a carico di una ristretta popolazione di cellule staminali o cellule da essere derivate (progenitori) che sarebbero responsabili dell'insorgenza della neoplasia e della resistenza alle terapie.

Le cellule staminali (SC) sono cellule non specializzate che, con una divisione asimmetrica, generano una cellula figlia identica a quella originale (self-renewal) e un'altra rappresentata dalla cellula progenitrice (PC). Quest'ultima è responsabile della creazione di una progenie di cellule differenziate, che costituiranno la maggior parte del tessuto. Le cellule staminali sono classificate in diversi tipi:

- Totipotenti: cellule in grado di generare anche gli annessi embrionali.
- Pluripotenti: cellule in grado di generare qualsiasi tipo cellulare dell'organismo. Da esse, infatti, derivano i tre foglietti embrionali.
- Multipotenti o Cellule Staminali Adulte (ASC): cellule in grado di effettuare il self-renewal, ma sono già indirizzate verso il differenziamento in un organo specifico.

Normalmente, esistono due gruppi di cellule staminali. Il primo è composto da una limitata popolazione di SC quiescenti (bloccate in fase G0) che funzionano da riserva cellulare; la loro replicazione è un evento raro ed esse possiedono potenziale proliferativo illimitato. Il secondo gruppo, invece, è rappresentato dalla maggior parte delle SC, che si replicano contribuendo allo sviluppo o alla riparazione dei tessuti⁷³⁻⁷⁴.

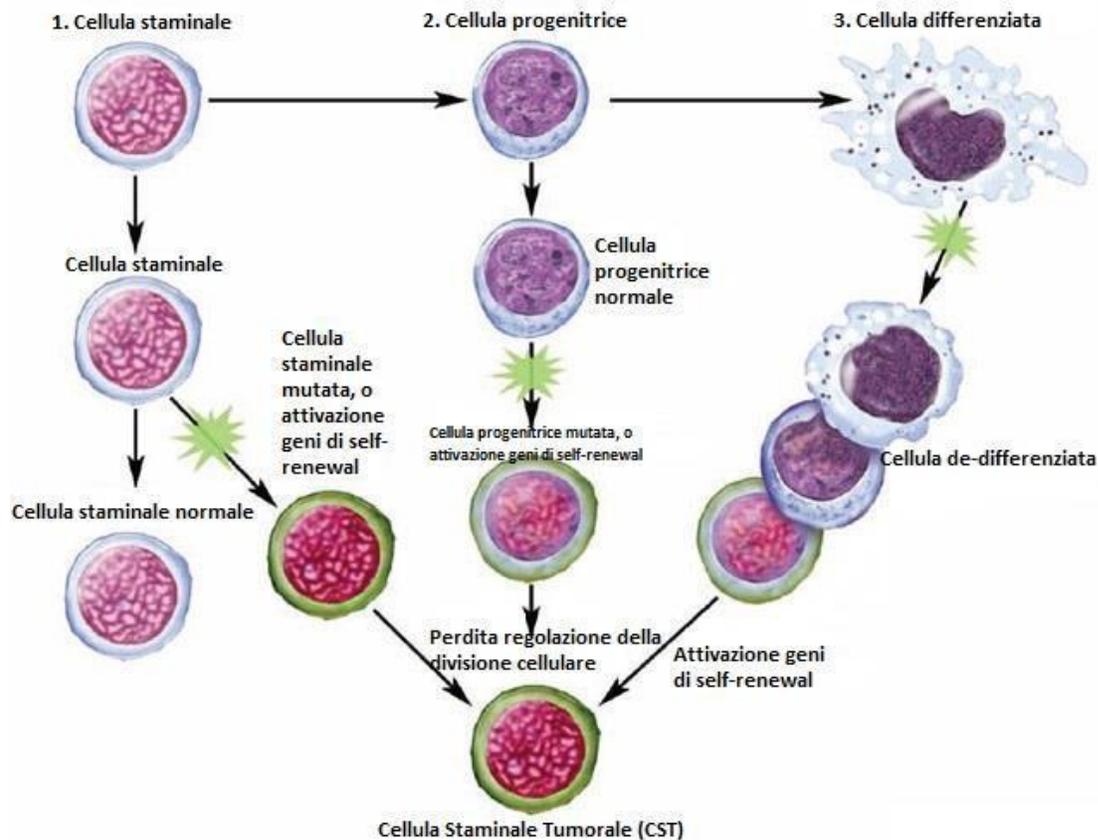


Figura 1: Cellula Staminale Tumorale⁷⁵.

Le cellule con elevato indice di proliferazione sono soggette allo sviluppo di alterazioni genetiche e/o epigenetiche responsabili della carcinogenesi. Alterazioni a carico della SC possono quindi portare allo sviluppo di una popolazione di cellule staminali tumorali (CST), dette anche cellule tumorali

inizianti (TIC). Le CST potrebbero derivare anche, in alternativa, da cellule progenitrici (PC) che acquisiscono le caratteristiche delle SC. Le normali SC e le CST condividono una serie di caratteristiche molecolari e funzionali.

In primis, la presenza di self-renewal (tramite l'alterazione di pathway chiave come Wnt, BMI-1, Notch, Hedgehog, PTEN e p53) è una caratteristica comune fra SC e CST. Le CST sono in grado di mantenere la capacità di differenziamento in multilineage, generando una "gerarchia" di popolazioni cellulari. L'esistenza delle CST permette di

spiegare la presenza, nei tumori, di sottotipi cellulari parzialmente differenziati somiglianti alle cellule dell'organo normale (organogenesi aberrante).

Inoltre, le CST condividono con le SC un basso indice di proliferazione (nonostante il potenziale proliferativo sia elevato, se non illimitato). Ciò le rende resistenti ai comuni trattamenti chemioterapici citotossici, che colpiscono le cellule con attività proliferativa elevata. La resistenza al trattamento chemioterapico è dovuta anche all'espressione di proteine appartenenti alla famiglia dei trasportatori di membrana ABC (che mediano il trasporto attivo dei farmaci all'esterno della cellula), all'attivazione di telomerasi e alla presenza di

fattori anti-apoptotici (Bcl-2, Bcl-xL, FLIP e PED)

Negli ultimi anni c'è stato un crescente interesse, da parte della ricerca scientifica⁷⁶⁻⁷⁷, nei confronti dell'isolamento e della propagazione di cellule staminali/progenitrici nei mielomi⁷⁸ e nelle neoplasie solide. Le problematiche principali legate a tale aspetto della ricerca sono l'assenza di marcatori specifici o di criteri morfologici in grado di riconoscere le diverse popolazioni cellulari e l'invasività delle procedure necessarie al loro isolamento⁷⁹. Nonostante ciò, l'identificazione di molecole presenti sulla superficie cellulare ha permesso l'isolamento di tali cellule tramite citometria a flusso. I mielomi sono stati i primi tumori ad essere caratterizzati in tal modo, grazie all'espressione di un fenotipo CD34⁺ CD38⁻⁷⁸. Successivamente, la tecnica è stata allargata anche ai tumori solidi (mammella⁸⁰, cervello, prostata, colon, ovaio e melanoma). Nel carcinoma mammario, la popolazione staminale presenta come marcatori di superficie CD24⁺CD44^{low}⁸⁰⁻⁸¹. Un ulteriore marcatore di staminalità sarebbe l'aldeide deidrogenasi 1 (ALDH1); tale enzima catalizza la conversione delle aldeidi nei corrispondenti acidi che utilizzano NAD⁺(P) come cofattore e potrebbe avere un ruolo nel differenziamento precoce delle SC mediante ossidazione del retinolo in acido retinoico⁸². Altri dati sperimentali mettono in evidenza la presenza di un'elevata attività dell'enzima ALDH1 nelle cellule staminali/progenitrici ematopoietiche e neurali (umane e murine)⁸³⁻⁸⁴. L'incremento dell'attività dell'ALDH1 è stato per la prima volta riscontrato nelle popolazioni di SC di mieloma multiplo e leucemia mieloide acuta (AML)⁸⁵.

Tale incremento è stato osservato anche in mammosfere umane, sia normali che tumorali. Di conseguenza, l'attività aumentata dell'ALDH1 risulta un marker sia per le normali popolazioni di SC/PC sia per quelle tumorali. Al fine di valutare le caratteristiche di staminalità del campione isolato, il nostro studio ha utilizzato ALDH1 per evidenziare tale proprietà.

Infine, si è osservato che la Citocheratina 5 (CK5) può essere considerata un marker sia di SC che di cellule progenitrici bi-potenziali nel normale tessuto mammario⁸⁶⁻⁸⁷. Nei tumori, le cellule CK5⁺ presentano proprietà di TIC.

Riassumendo, l'origine dei tumori è spiegata con due modelli:

- Modello delle cellule staminali tumorali (CST) o cellule inizianti tumorali (TIC): le cellule suscettibili di trasformazione neoplastica sono esclusivamente le SC e le progenitrici (rappresentanti l'1-2% della massa tumorale). Esse sarebbero in grado di accumulare mutazioni genetiche e cambiamenti epigenetici in grado di guidare la progressione della malattia e di sviluppare la resistenza al trattamento. Tale modello è supportato dalla vita lunga e dall'alto potenziale proliferativo delle CST.

- Modello dell'evoluzione clonale (o modello stocastico): la cellula che subisce la trasformazione neoplastica può essere qualsiasi cellula dell'organismo; le cellule figlie acquisiscono mutazioni addizionali in grado di generare una massa tumorale eterogenea.

Di conseguenza, nel modello delle CST le cellule neoplastiche sono in numero limitato (1-2%) rispetto al modello stocastico. Se i tumori seguissero il modello stocastico, la terapia citotossica dovrebbe colpire tutte le cellule proliferanti e differenziate; nel modello delle CST, le cellule tumorali sono molto difficili da colpire. La loro persistenza spiega il verificarsi delle recidive tumorali dopo una terapia apparentemente efficace. Pertanto, il modello delle CST è quello più vicino alla realtà, che può imporsi come modello universale della genesi delle neoplasie.

In conclusione, l'eterogeneità tumorale rappresenta una delle problematiche più attuali per il clinico-ricercatore, portando frequentemente al fallimento terapeutico. Per questo

motivo è necessario inquadrare il dinamismo fenotipico del tumore e monitorare tutti i cambiamenti nel tempo, in vista di eventuali variazioni terapeutiche sulla base dei risultati. Il raggiungimento di questo obiettivo è sempre più vicino grazie all'utilizzo della biopsia liquida.

2.2 Biopsia liquida

La biopsia è una procedura di primaria importanza nella gestione del paziente oncologico, risultando indispensabile per definire accuratamente la diagnosi, la prognosi e la predittività della risposta o della resistenza al trattamento. Inoltre, data la crescente presenza di terapie a target molecolare, risulta utile nel determinare la presenza/assenza di alterazioni che potrebbero essere sfruttate dal punto di vista terapeutico.

La biopsia tissutale, con analisi diretta del tumore, fornisce informazioni essenziali sullo stato del tumore e sulle alterazioni presenti. Tuttavia, la biopsia tissutale è limitata da una serie di problematiche: la difficoltà di reperire quantità adeguate di tessuto, la bassa ripetibilità, gli errori di campionamento dovuti sia al prelievo di aree troppo piccole di tumore sia all'eterogeneità tumorale. Oltre a questi problemi di natura esclusivamente procedurale, tale tipo di biopsia è condizionata anche dall'eventuale presenza di comorbidità, dalle condizioni generali del paziente e dalla sua compliance. Inoltre, i campioni ottenuti tramite le varie tecniche di biopsia vengono generalmente conservati con la fissazione in formalina e inclusione in paraffina (FFPE). Il procedimento può danneggiare il DNA e impedire l'analisi con le tecniche di routine (ad es. la reazione a catena della polimerasi, PCR). Probabilmente, il limite maggiore di tali tecniche è rappresentato dal fatto che il campione potrebbe non riuscire a catturare tutte le mutazioni/alterazioni presenti, a causa della eterogeneità tumorale presente all'interno della medesima lesione.

In genere, la biopsia chirurgica è la tecnica che consente di ottenere campioni adeguati di tessuto. Tuttavia, resta una procedura invasiva (che può portare anche a complicanze) e dispendiosa sia per il costo che per il tempo necessario ad effettuarla. Opzioni

alternative sono rappresentate dall'agoaspirazione (FNA) e dalla microbiopsia (CNB); tali tecniche producono campioni quantitativamente inferiori.

2.2.1 Vantaggi e limiti dell'utilizzo della biopsia liquida

La biopsia liquida rappresenta una promettente metodica non invasiva che risulta in grado di valutare lo stato genetico del tumore tramite l'analisi del DNA libero circolante (cfDNA) a livello plasmatico⁸⁸. Dal momento che i campioni ematici sono facilmente ottenibili, tale metodica può essere facilmente utilizzata come una tecnica integrativa delle biopsie tradizionali. Il cfDNA si forma in seguito alla necrosi delle cellule neoplastiche, con il rilascio di cellule morte o di detriti cellulari. Tali frammenti vengono processati dai fagociti che rilasciano il DNA in piccoli frammenti nel sangue. Prelevando un campione di sangue, si procede a separare la componente cellulare da quella plasmatica; da quest'ultima è possibile estrarre il cfDNA. Esso può essere analizzato per ricercare le medesime alterazioni rilevabili nel tumore primario; le tecniche si basano sull'amplificazione in PCR o sulla next-generation sequencing (NGS).

Ulteriori fonti di DNA nella biopsia liquida sono le cellule tumorali circolanti (CTC) e gli esosomi. Le CTC sono cellule tumorali intatte rilasciate nel flusso ematico utilizzate come fonte di DNA tumorale⁸⁹. Gli esosomi sono vescicole di membrana extracellulari, di 50-150nm⁹⁰; vengono rilasciate in circolo dalla maggior parte delle cellule e sono usate come fonte di DNA, RNA e proteine.

La biopsia liquida analizza direttamente il DNA, fornendo informazioni riguardanti lo stato dei geni neoplastici (EGFR, KRAS, NRAS, PIK3CA e BRAF).

Poiché la biopsia liquida richiede un semplice prelievo ematico, essa può essere ripetuta diverse volte con un impatto minimo per il paziente. Una possibile applicazione, quindi, sarebbe il monitoraggio dei pazienti in terapia, fornendo un quadro completo della situazione genetica del tumore. Attualmente l'oncologia utilizza la diagnostica per immagini per monitorare l'andamento del trattamento, con la tomografia computerizzata (TC) e la tomografia ad emissione di positroni (PET), effettuate ogni 3-6 mesi. Con l'utilizzo della

biopsia liquida, sarebbe possibile sia abbattere i costi del monitoraggio evitando di usare tecniche dispendiose in termini di costi e tempo sia ridurre gli intervalli temporali dei controlli (ad es. a cadenza settimanale). La maggiore cadenza temporale delle biopsie consentirebbe uno stretto monitoraggio dello sviluppo delle resistenze farmacologiche ed eventuali variazioni della terapia. Nei pazienti che mostrano una risposta terapeutica completa, la biopsia liquida potrebbe consentire un migliore monitoraggio della carica tumorale e la valutazione della malattia residua minima (MRD). Infine, la biopsia liquida consentirebbe di ovviare ai problemi legati alla quantità limitata di tessuto che si ottiene con le altre tecniche (FNA o microbiopsia) e potrebbe rappresentare una valida alternativa nei pazienti che non possono effettuare una biopsia tissutale.

La biopsia liquida sembra essere una tecnica altamente promettente, tuttavia esistono problematiche di natura tecnica che devono essere necessariamente superate. Infatti, anche se la maggior parte dei tumori rilascia DNA nel circolo sistemico, la quantità di questo DNA è estremamente variabile e proporzionale alla carica tumorale totale: i pazienti con neoplasie allo stadio iniziale potrebbero presentare una quantità di cfDNA insufficiente per un'analisi accurata (in alcuni casi rappresenta meno dell'1% del DNA libero circolante)⁸⁸⁻⁹¹. Inoltre, deve essere considerata la presenza nel DNA libero circolante di DNA genomico normale; sono necessarie quindi tecniche altamente sensibili in grado di identificare e sequenziare anche piccole quantità di cfDNA tumorale.

2.2.2 Prospettive future della biopsia liquida

Attualmente, le tecniche diagnostiche utilizzate nel follow-up del carcinoma mammario assicurano alle pazienti un trattamento appropriato. La biopsia liquida deve riuscire a competere con queste ultime, dimostrando di possedere un elevato valore predittivo positivo, una buona sensibilità e un'eccellente specificità, al fine di ottenere percentuali accettabili di falsi positivi e falsi negativi. Tale tecnica offre la possibilità di studiare in maniera più dettagliata la progressione della malattia metastatica, chiarendone persino gli aspetti molecolari. La biopsia liquida potrebbe essere utilizzata nel campo della diagnosi oncologica e del monitoraggio terapeutico, consentendo di effettuare cambiamenti della

terapia in base ai dati di tipo molecolare così ottenuti. Poiché tale tecnica potrebbe essere annoverata fra le metodiche di prima scelta per il monitoraggio della neoplasia, la ricerca sta portando all'implementazione di test sempre più rapidi, affidabili e allo stesso tempo meno invasivi.

2.3 Cellule tumorali circolanti

Secondo i nuovi modelli di cascata metastatica⁵⁸, le cellule tumorali circolanti (CTC) sono quelle cellule che si distaccano dal tumore primitivo, entrando nel circolo sistemico mediante l'extravasazione in maniera diretta o dopo un precedente passaggio nel sistema linfatico. Tali cellule furono isolate già negli anni '50 dai ricercatori Engell e Roberts e dal loro team, che dimostrarono la presenza di cellule tumorali nel sangue di pazienti affetti da neoplasie (carcinomi della mammella, dell'ovaio, del polmone, della prostata e dello stomaco)⁹². Nonostante sia trascorso tempo dalla loro identificazione, il destino delle CTC nel circolo sistemico rimane ancora poco conosciuto e per questo oggetto di ricerca. Infatti, non tutte le cellule tumorali che si dissociano dal tumore primitivo sono in grado di colonizzare altri tessuti, poiché sono sottoposte sia a fenomeni di immunomodulazione sia a forze emodinamiche che le danneggiano. I capillari degli organi bersaglio (in particolare del polmone e del fegato, che sono gli organi più frequentemente colpiti dal processo di metastatizzazione) possiedono delle dimensioni tali da bloccare meccanicamente le CTC presenti in circolo, che rimangono così intrappolate nei tessuti. I capillari, in media, presentano un diametro compreso fra i 3 e gli 8 μm ; le CTC, al contrario, hanno dimensioni che variano tra i 20-30 μm di diametro. Esistono anche altri fattori responsabili della stasi delle CTC a livello dell'organo bersaglio, come la pressione sanguigna nel circolo locale e la deformabilità delle CTC stesse.

Alcune evidenze suggeriscono la presenza di piccoli gruppi di CTC in circolo che possono replicarsi e sopravvivere, portando alla formazione di “*cluster*” o “micrometastasi”⁹³, gruppi cellule maggiormente predisposte all'invasione dell'organo bersaglio e alla proliferazione a livello di quest'ultimo.

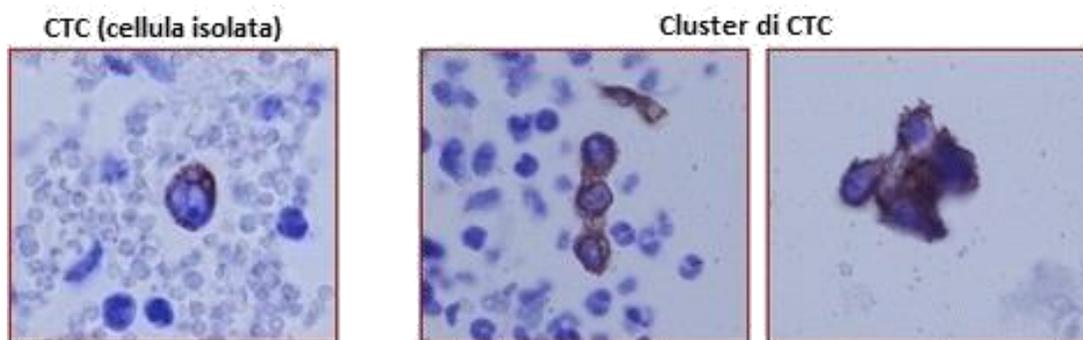


Figura 2: CTC isolate e in cluster⁹⁴.

Come suggerito da diverse evidenze sperimentali, solo il 3% delle CTC è in grado di proliferare, mentre le rimanenti si ritrovano in uno stato di “dormienza”, cioè di non-proliferazione e non-apoptosi. Tale caratteristica ha un ruolo preponderante dal punto di vista clinico, poiché tali cellule dormienti sono ancora in grado di dare origine a localizzazioni secondarie della malattia, nel momento in cui il microambiente rimuove le condizioni determinanti lo stato dormiente (ad es. fenomeni di immunomodulazione, acquisizione di nuove mutazioni, scomparsa degli inibitori dell’angiogenesi o aumento dei fattori di crescita)⁹⁵. Il fenomeno della dormienza sarebbe in grado di spiegare la recidiva di malattia in pazienti precedentemente trattati per la neoplasia a distanza di molti anni.

In conclusione, la valutazione delle CTC nel sangue può essere sfruttata al fine di attestare l’avvenuta disseminazione neoplastica. La sola identificazione di tali cellule rappresenta di per sé un fattore di rischio per la disseminazione metastatica futura e, di conseguenza, di una prognosi infausta. Allo stesso tempo, le CTC possono essere utilizzate come marker per il monitoraggio del trattamento farmacologico; la ricerca tende a progredire in questo senso, portando all’identificazione e alla caratterizzazione del genotipo/fenotipo delle CTC, che risultano fondamentali nella scelta di strategie terapeutiche costruite sul singolo paziente.

2.3.1 Caratteristiche biologiche, significato e rilevanza clinica

Dal punto di vista biologico, le CTC sono state primariamente identificate come cellule di origine epiteliale⁹⁶⁻⁹⁷ e in seguito è stata dimostrata la loro natura neoplastica (con analisi di ibridazione genomica comparativa); ciò avvenne dopo la prima scoperta di cellule citocheratina-positive (CK+) nel midollo osseo.

La domanda successiva posta dalla ricerca sulle CTC è stata quella di capire se queste cellule fossero “vive” o “morte”; fisiologicamente, infatti, una cellula epiteliale che si distacca dall'organo originario dà inizio a un processo di apoptosi particolare, l'“anoikis”. Le cellule tumorali circolanti, mediante evidenze indirette, sembrano possedere un'aumentata resistenza a tale processo⁹⁸⁻⁹⁹ e una vitalità in grado di consentire la coltivazione. Tuttavia, le CTC risultano maggiormente propense al normale processo di apoptosi¹⁰⁰; esse sono responsabili della creazione di “*remnants*” rilevabili nel circolo sistemico di alcuni pazienti.

Infine, dal punto di vista molecolare, le CTC presentano ampia variabilità di espressione genica di recettori per fattori di crescita, proteasi, molecole di adesione e antigeni di istocompatibilità. Tale aspetto è un'ulteriore evidenza della marcata eterogeneità delle neoplasie.

2.3.2 Metodiche per l'isolamento delle CTC nel sangue periferico

L'identificazione e la caratterizzazione molecolare delle CTC prevede una procedura di arricchimento, come la centrifugazione su gradiente di densità (Ficoll), la selezione immunomagnetica con l'utilizzo di anticorpi contro antigeni tumore-specifici (selezione positiva) o contro l'antigene leucocitario comune CD45 (selezione negativa) oppure la filtrazione prima della tecnica di determinazione. Gli anticorpi diretti verso gli antigeni tumore-specifici sono quelli diretti contro le molecole di superficie delle cellule epiteliali, come le citocheratine (CK7 e CK8) o EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule); tali anticorpi sono coniugati a biglie paramagnetiche. L'arricchimento è una procedura importante nello studio delle CTC, poiché la quantità presente in circolo è spesso esigua anche in pazienti metastatici, in genere al di sotto di 10 cellule/mL)¹⁰¹.

Le tecniche utilizzate nello studio delle CTC sono suddivise in metodiche immunologiche e metodiche di analisi degli acidi nucleici.

Method	Estimated sensitivity	Advantages	Disadvantages
PCR-based approaches	10^{-4} - 10^{-6}	(i) Rapid, quantitative(ii) High sensitivity(iii) Small sample volume required	(i) Does not allow for cell-by-cell analysis(ii) Does not discriminate between viable and nonviable cells(iii) Low specificity(iv) Technical issues with mRNA degradation, etc.
Flow cytometry	10^{-4} - 10^{-5}	(i) Rapid, quantitative(ii) Cell-by-cell analysis(iii) Multiparameter(iv) High specificity(v) Identification of viable versus nonviable cells(vi) Potential to sort CTCs for additional characterization	(i) Limited sensitivity(ii) Requirement for large sample volume unless sample enrichment used(iii) No visual confirmation of cell specificity(iv) Technically and analytically challenging
Laser scanning cytometry	10^{-4} - 10^{-5}	(i) Rapid, quantitative(ii) Cell-by-cell analysis(iii) Multiparameter(iv) High specificity(v) Identification of viable versus nonviable cells(vi) Morphological analysis	(i) Limited sensitivity(ii) Technically and analytically challenging
CellSearch (Veridex)	10^{-7}	(i) High sensitivity and specificity(ii) Automated, quantitative(iii) Highly reproducible(iv) Moderate sample volume needed(v) Identification of viable versus nonviable cells(vi) Commercially available(vii) Only assay with FDA approval	(i) Limited analysis parameters(ii) Use of EpCam to capture CTCs may miss some tumor cells(iii) Multiple enrichment and processing steps may result in loss of CTCs(iv) Partially subjective readout
CTC microchip	10^{-7} +	(i) High sensitivity and specificity(ii) Quantitative(iii) Minimal processing and shear stress(iv) Identification of viable versus nonviable cells(v) Potential to recover CTCs for additional characterization	(i) Technology is not commercially available(ii) Use of EpCam to capture CTCs may miss some tumor cells(iii) Partially subjective readout
EPISPOT	10^{-7} +	(i) High sensitivity and specificity(ii) Quantitative(iii) Multiparameter(iv) Only viable tumor cells are detected	(i) Requires 48-hour culture of isolated CTCs before analysis

Tabella 3: Vantaggi e svantaggi dei principali metodi di analisi delle CTC [Allan AL., Journal of Oncology 2010].

Le tecniche immunologiche consentono di isolare in maniera precisa ogni singola cellula, evidenziata tramite colorazioni immunocitochimiche associate all'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti verso gli antigeni epiteliali o tumore-specifici (più frequentemente rappresentati dalle citocheratine). In alcune neoplasie, tuttavia, tali marcatori possono essere persi causando falsi negativi e l'impiego di anticorpi differenti può causare variazioni nella specificità. Il vantaggio principale delle tecniche immunologiche è rappresentato dalla notevole caratterizzazione molecolare a cui conducono, grazie alla possibilità di misurare l'espressione di specifici marker biologici o di effettuare l'ibridazione in situ. Nonostante i sostanziali vantaggi, la metodica immunologica non è in grado di processare grandi

volumi di materiali in maniera rapida; per questo motivo è necessario fare ricorso a sistemi computerizzati di analisi visiva, di microscopia digitale e a metodi semiautomatici, come la citometria a flusso o a laser.

Una risposta alle problematiche sollevate è stata l'introduzione di un sistema semi-automatizzato, il *Cell Search*[®] *System (Veridex)*. Tale metodica è attualmente tra le più validate e utilizza una tecnica di isolamento tramite cattura cellulare con anticorpi diretti contro specifici antigeni di superficie epiteliale, fisiologicamente non presenti sui leucociti. L'antigene in assoluto più utilizzato

è l'EpCAM, proprio per il fatto di essere universalmente espresso nelle cellule di origine epiteliale e, allo stesso tempo, assente nei leucociti. Nel *Cell Search*, gli anticorpi anti EpCAM vengono coniugati a biglie ferrose magnetiche per consentire la purificazione delle cellule catturate dall'anticorpo tramite un

campo magnetico. In seguito, le cellule così selezionate vengono marcate mediante fluorescenza per CK (selezione positiva), per l'antigene leucocitario comune CD45 (selezione negativa) e con un colorante nucleare (DAPI, che lega il DNA nelle regioni ricche di sequenze A-T). Le CTC sono caratterizzate da un profilo $CK^+/CD45^-/DAPI^+$. Nonostante la notevole affidabilità del *Cell Search*[®] *System* (risulta l'unico approvato dalla FDA) e la sua standardizzazione, soltanto una porzione dei pazienti con neoplasia metastatica presenta una positività per le CTC, con valori di circa 1 CTC/mL e bassa purezza delle cellule isolate¹⁰²⁻¹⁰³.

Contemporaneamente allo sviluppo del *Cell Search*[®] *System*, è stata sviluppata un'ulteriore metodica, la *CTC-chip*. Il chip è rappresentato da un array di micropozzetti rivestiti con anticorpi anti-EpCAM cui si legano le CTC presenti nel sangue, veicolate con un flusso laminare controllato. Un'altra tecnica basata sull'immunocitochimica è il test funzionale *EPISPOT* (EPIthelial ImmunoSPOT): dopo l'eliminazione delle cellule $CD45^+$, la metodica identifica le CTC mediante la misurazione di proteine secrete, diffuse o rilasciate durante le prime 24-48 ore di una cultura a breve termine.

Le tecniche basate sull'analisi degli acidi nucleici ricercano e caratterizzano gli mRNA tumore-associati, mediante RT-PCR. I prodotti ottenuti possono essere separati tramite

elettroforesi su gel di agarosio o, più spesso, usati per una reazione quantitativa mediante Real-Time PCR. Tali tecniche risultano estremamente sensibili, di conseguenza si è ripresentato il problema dei falsi positivi. In questo caso, la fonte di errore è molto difficile da determinare, poiché diversi fattori possono influenzare la metodica:

1. Utilizzo di marcatori non specifici per il tumore: la presenza di un target che viene espresso in altre cellule, anche se a livelli notevolmente minori, porta ad una sovrastima dei livelli del suddetto marker.
2. Utilizzo di marcatori che presentino pseudogeni che portano ad un'espressione illegittima: spesso è il meccanismo più frequente quando si utilizzano le metodiche con RT-PCR. A questo proposito, la CK19, un marcatore utilizzato per le CTC del carcinoma mammario, presenta due pseudogeni con elevata omologia di sequenza.
3. Contaminazione con cellule epiteliali o acidi nucleici durante il prelievo e il processamento del campione.

Recentemente, è stato sviluppato l'*AdnaTest*, un kit commerciale per identificare le CTC tramite RNA. La metodica cattura cellule MUC1⁺/HER2⁺/EpCAM⁺ e in seguito, tramite RT-PCR non quantitativa, identifica le cellule che esprimono i trascritti presunti di geni tumore-specifici¹⁰⁴. Il limite principale della tecnica è rappresentato dal fatto che MUC1 risulta espresso anche dai linfociti T attivati¹⁰⁵.

In generale, l'RT-PCR risulta una metodica economica e molto sensibile, in grado di rilevare una cellula tumorale in 10 cellule non neoplastiche. Tuttavia, la mancanza di marcatori univoci per ogni neoplasia spinge alla ricerca continua di mRNA tumore o organo-specifici.

2.3.3 Cellule tumorali circolanti nel carcinoma mammario

Da lungo tempo è noto che le neoplasie solide provocano la disseminazione nel circolo sistemico di cellule che formano le metastasi, anche a distanza di anni dalla resezione completa del tumore.

Nel carcinoma della mammella, soltanto la metà delle pazienti con una positività delle CTC sviluppa delle metastasi; le altre presentano un intervallo libero da malattia metastatica di oltre 10 anni di follow-up¹⁰⁶. Tali dati correlano con quelli ricavati dai modelli animali, giungendo alla conclusione che una porzione significativa di pazienti positive per le CTC non svilupperà mai una metastasi.

Per spiegare tale comportamento è stata formulata l'ipotesi della latenza o "quiescenza" delle CTC nel carcinoma mammario¹⁰⁷. Tuttavia, allo stato attuale la conoscenza in tale campo è limitata; sono ignote sia le condizioni necessarie alla progressione della latenza sia i meccanismi dell'equilibrio tra replicazione tumorale e morte cellulare. Secondo alcuni studiosi, tale equilibrio è influenzato da diversi fattori del microambiente o da ulteriori mutazioni guadagnate dalle cellule neoplastiche. Ciò porterebbe, in alcune pazienti, all'attivazione delle CTC dormienti che darebbero inizio al processo metastatico.

Le pazienti con carcinoma mammario possiedono CTC che esprimono e secernono CK19, marker considerato di staminalità. Ciò ha fatto ipotizzare che una parte delle CTC presenti nelle fasi precoci delle neoplasie possieda le caratteristiche di cellule staminali, non replicanti in situ e resistenti per questo alla chemioterapia citotossica. Da tali evidenze si è sviluppata la teoria delle "cancer stem cells" o cellule tumorali inizianti (TIC). Negli ultimi anni la ricerca ha approfondito le eventuali indicazioni prognostiche e terapeutiche che possono derivare dagli studi sulle CTC. Diversi lavori hanno dimostrato come la presenza di >5 CTC/7,5mL di sangue prima dell'inizio della terapia si associ a un minore intervallo libero da malattia e una peggiore sopravvivenza¹⁰⁶. Mancano studi riguardanti l'utilizzo di una terapia adiuvante aggressiva in questa tipologia di pazienti, nonostante la possibilità di ottenere una migliore sopravvivenza. Tuttavia, la mancanza di dati non permette di predire, per il singolo paziente, il reale beneficio della terapia adiuvante aggressiva.

CAPITOLO II

RAZIONALE E OBIETTIVI DELLO STUDIO

1. Ipotesi

Il carcinoma mammario ha beneficiato, negli ultimi due decenni, di un considerevole calo della mortalità, dovuto sia all'introduzione dei programmi di screening sia agli avanzamenti in campo terapeutico. Tuttavia, un rilevante numero di pazienti mostra resistenza al trattamento sistemico, a causa dell'eterogeneità tumorale e della sua natura dinamica.

Le “*tumor initiating cells*” (TIC, cellule tumorali inizianti) rappresentano una ristretta sottopopolazione di cellule tumorali con la capacità di self-renewal, di iniziazione tumorale e di determinare progressione e recidiva tumorale. Tali caratteristiche di staminalità sono alla base della resistenza alla chemioterapia citotossica e alla radioterapia opposta da determinate neoplasie, sia negli stadi iniziali sia in quelli più avanzati, metastatici.

Data la premessa, l'identificazione e caratterizzazione di tali cellule e dei loro marker specifici risulterebbe uno strumento adatto ad aumentare la probabilità di risposta terapeutica e a prolungare la sopravvivenza. Tuttavia, l'isolamento delle TIC allo scopo di effettuare uno studio biomolecolare richiede metodiche complessi e, soprattutto, invasive (ad es. biopsia o intervento chirurgico).

Al fine di superare tali difficoltà, sulla base di numerosi studi, si è dimostrato che le CTC possiedono caratteristiche fenotipiche simili alle TIC: *l'identificazione e l'analisi delle CTC si dimostrerebbe sovrapponibile e rappresentativa del medesimo procedimento effettuato sulle TIC, senza il ricorrere a procedure invasive per l'ottenimento del campione.*

2. Obiettivi dello studio

- 1) Isolamento di CTC vitali dal sangue periferico di pazienti con carcinoma mammario avanzato e metastatico prima dell'avvio del trattamento sistemico.
- 2) Caratterizzazione molecolare delle CTC isolate allo scopo di analizzarne le proprietà biologiche e di comparare queste ultime sia al tumore primitivo sia alle lesioni metastatiche.
- 3) Identificazione di metodi di coltura "ex vivo" delle CTC, al fine di sviluppare un modello preclinico che potrebbe dimostrarsi efficace per una migliore decisione terapeutica personalizzata.

CAPITOLO III

PAZIENTI E METODI

1. Selezione delle pazienti

Lo studio, ancora in corso, deriva dalla collaborazione tra l'Unità di Senologia del Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, il Dipartimento di Medicina molecolare e Biotecnologie mediche (Università Federico II di Napoli) e il *Breast Center* del Baylor College of Medicine (Houston, Texas, USA).

Da dicembre 2015 sono state reclutate, presso l'Unità di Senologia dell'Università Federico II, 61 pazienti con carcinoma mammario definito "avanzato". Di queste ne sono state selezionate 21 che presentavano localizzazione metastatica. È stata riscontrata disponibilità e cooperazione da parte delle pazienti durante lo svolgimento dello studio; considerata la peculiare situazione clinica di queste donne, è un aspetto non del tutto scontato. Infatti, i pazienti oncologici normalmente devono eseguire molteplici esami per la diagnosi e il follow-up e per questo risultano meno propensi ad eseguire ulteriori procedure se non fortemente necessarie.

Per il reclutamento, abbiamo applicato i seguenti criteri di inclusione:

- Età > 18 anni.
- Carcinoma mammario localmente avanzato e metastatico
- Disponibilità di un campione prelevato dal tumore primitivo e, ove disponibile, dalle localizzazioni metastatiche.
- Necessità di identificare un trattamento antitumorale sistemico.

Il prelievo è stato effettuato alla baseline, prima di intraprendere un nuovo trattamento sistemico. Tale espediente ha lo scopo di massimizzare l'isolamento delle cellule tumorali circolanti, che si ritrovano nel circolo sistemico in numero esiguo.

2. Materiali e metodi

L'isolamento delle CTC dai campioni di sangue venoso periferico delle nostre pazienti è stato effettuato utilizzando il kit RosetteSep™ Human CD45 Depletion Cocktail (STEMCELL Technologies Inc.). Tale metodica di arricchimento prevede una selezione negativa (nei confronti dei linfociti) seguita da una separazione per gradiente di densità.

I complessi anticorpali tetrameric (TAC, *Tetrameric Antibody Complexes*) sono diretti contro la glicoforina A degli eritrociti e il CD45 dei leucociti. Interagendo con i loro bersagli, tali anticorpi portano alla formazione di “rosette” costituite da globuli rossi e leucociti.

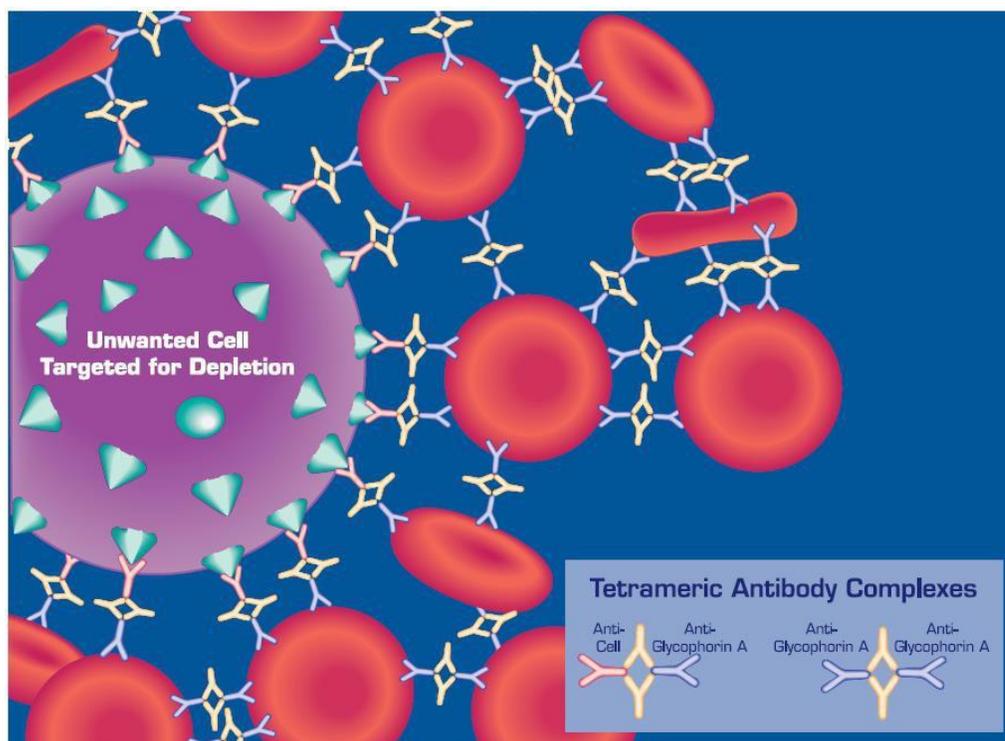


Figura 3: Rosetta di cellule indesiderate ed eritrociti formata dai TAC [www.stemcell.com].

La separazione per gradiente di densità è ottenuta mediante centrifugazione; essa consente la sedimentazione delle rosette sul fondo della provetta e l'isolamento delle CTC tra lo strato di Ficoll e quello di plasma. Le CTC, se presenti nel campione,

vengono prelevate e sottoposte ad ulteriori indagini per identificare geni e/o biomarker di superficie.

2.1 *RosetteSep™ Kit*

- Composizione del cocktail: contiene una combinazione di anticorpi monoclonali di topo e di ratto, prelevati dal fluido ascitico del topo o dal soprannatante della coltura di ibridoma mediante tecnica cromatografica.
- Anticorpi: sono legati in complessi tetrameric (TAC) e sono diretti contro l'antigene CD45 leucocitario e la glicoforina A eritrocitaria. L'anticorpo monoclonale appartiene alla classe IgG₁. Tale composto è un reagente biologico, che non può essere completamente caratterizzato o quantificato; un certo grado di variabilità è inevitabile.
- Ficoll-Paque PLUS: è una soluzione sterile contenente Ficoll PM400, sodio diatrizzato e EDTA disodico calcio. Il composto ha il ruolo di generare un gradiente di densità per la separazione cellulare: esso è stato ottimizzato per l'isolamento dei linfociti umani dal sangue periferico.
- PBS (*Phosphate-buffered Saline*, tampone fosfato salino).
- FBS al 2% (*Fetal Bovine Serum*, siero fetale bovino).
- Centrifuga e comuni oggetti di laboratorio.

2.2 *Controllo di qualità*

- Realizzare campioni di controllo insieme ai campioni oggetto di studio per monitorare la corretta esecuzione della metodica.
- Verificare che i reagenti si trovino alla temperatura desiderata prima di avviare la procedura.

2.3 Controlli preliminari richiesti

- Preparare reagenti e soluzioni prima dell'avvio della procedura. Etichettare il materiale correttamente: dati del paziente, data, identificazione del laboratorio e del ricercatore che effettua la metodica.
- Preparare soluzioni fresche prima di ogni step.

2.4 Procedura

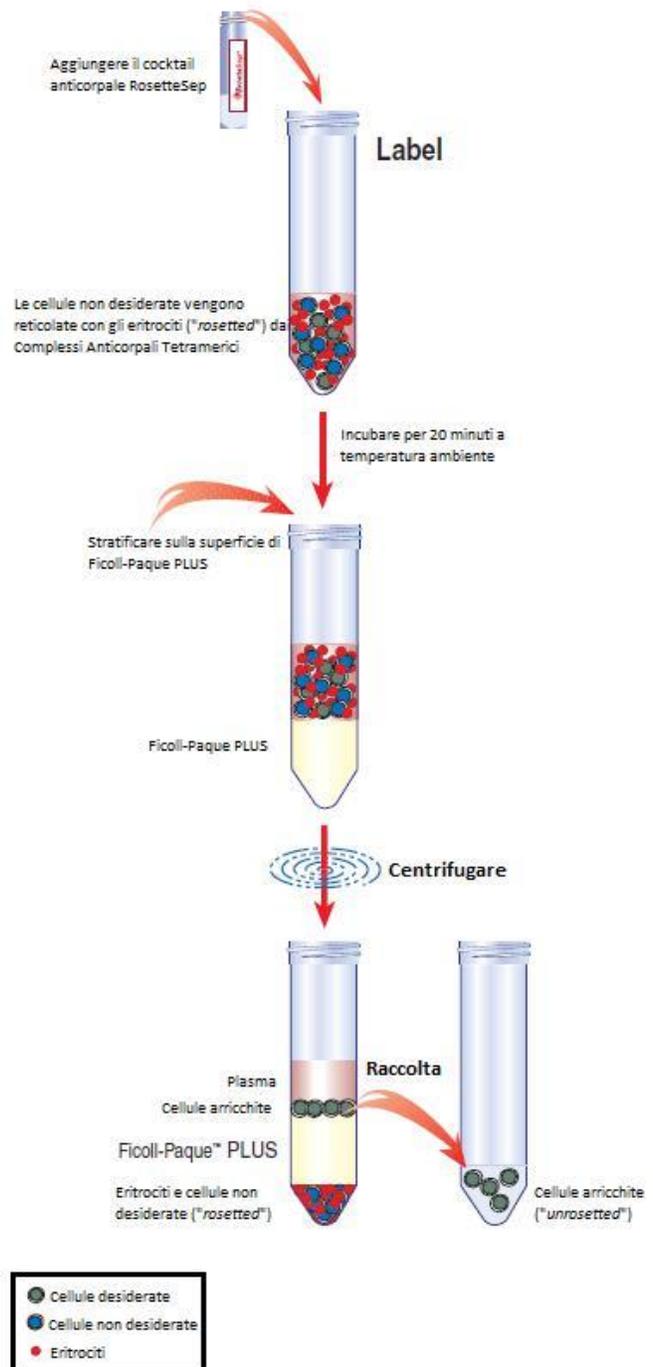


Figura 4: RosetteSep™ Human CD45 Depletion Cocktail, procedura [www.stemcell.com]

- Assicurarsi che tutti i reagenti si trovino a temperatura ambiente, allo scopo di garantire l'efficacia della reazione antigene-anticorpo.
- Aggiungere 100µL di RosetteSep™ Human CD45 Depletion Cocktail ogni 2 mL di sangue periferico in una provetta da 15 mL.
- Incubare per 20 minuti a temperatura ambiente.
- Diluire quanto ottenuto con un eguale volume (2mL) di PBS + 2% FBS; mescolare delicatamente capovolgendo la provetta 3-5 volte.
- Stratificare il campione diluito sulla superficie del Ficoll-Paque PLUS (3 mL). In tale fase, bisogna evitare la miscelazione del campione con il Ficoll-Paque PLUS, seguendo le raccomandazioni dell'azienda produttrice per quanto riguarda il volume di provetta da utilizzare.
- Centrifugazione a 1200 x g per 20 minuti a temperatura ambiente.
- Rimuovere le cellule arricchite dal Ficoll-Paque PLUS all'interfaccia col plasma. Alcune volte risulta difficoltoso individuare le cellule arricchite, soprattutto quando le CTC presenti nel campione sono in numero esiguo. In tal caso bisogna procedere alla rimozione di un minimo quantitativo di Ficoll-Paque PLUS assieme alle cellule arricchite, per assicurarne il completo recupero.
- Lavare le cellule arricchite con PBS + 2% FBS. Ripetere tale operazione.
- Utilizzare le cellule arricchite per la successiva tecnica di analisi.

Per analizzare le CTC così ottenute, abbiamo scelto di identificare l'espressione dei seguenti antigeni:

- Recettore ER, recettore per gli estrogeni.
- Recettore HER-2, recettore per il fattore di crescita dell'epidermide umano 2.
- Enzima ALDH1, generalmente espresso da cellule con caratteristiche di staminalità.

- Vimentina, proteina che indica l'intervento del processo di "transizione epitelio-mesenchimale" subito dalle CTC, che consente loro di distaccarsi dal tumore primitivo e acquisire caratteristiche di invasività e potenziale metastatico.

Tutti gli antigeni ricercati sono rappresentativi degli aspetti che il nostro studio intende analizzare.

La ricerca dei recettori ER e HER-2 ha lo scopo di comprendere la misura in cui la crescita neoplastica risulta influenzata dall'azione di ormoni e/o fattori di crescita. Tale evidenza consente di pianificare trattamenti di blocco recettoriale o di inibizione del substrato in caso di positività, o, in caso di negatività, di studiare lo sviluppo di eventuali pathway di crescita alternativi.

La ricerca dell'ALDH1 e della vimentina tendono a dimostrare la teoria della staminalità tumorale come causa di mancata risposta e recidiva della neoplasia e, allo stesso tempo, l'acquisizione di un fenotipo mesenchimale che concede alla cellula invasività e potenziale metastatico.

La tecnica utilizzata per l'individuazione degli antigeni è rappresentata dall'immunofluorescenza. Si pone l'anticorpo specifico per l'antigene sulle cellule preparate. È possibile utilizzare sia l'immunofluorescenza diretta, con anticorpi direttamente coniugati a molecole fluorescenti (fluorocromi, ad es. FITC, TRITC, PE, etc.), sia l'immunofluorescenza indiretta, che evidenzia la reazione antigene-anticorpo mediante un ulteriore anticorpo specifico per il primo utilizzato coniugato a un fluorocromo. Dopo tali procedure, il campione marcato viene osservato al microscopio a fluorescenza o al microscopio confocale.

I fluorocromi più utilizzati sono rappresentati dalla fluorescina, che assorbe raggi ultravioletti ed emette luce verde mediante un microscopio illuminato da una fonte adatta, e il DAPI, un colorante organico fluorescente che lega le regioni del DNA ricche in sequenze A-T.

CAPITOLO IV

RISULTATI

1. Risultati

Sino ad ora, abbiamo individuato 61 pazienti potenzialmente eleggibili per lo studio. Tuttavia, soltanto 21 di tali pazienti rispettavano pienamente i criteri di inclusione sopracitati. I risultati sottostanti, inoltre, sono relativi all'isolamento e alla caratterizzazione delle CTC di 19 delle 21 pazienti, poiché in due casi il volume ematico prelevato è risultato insufficiente per lo svolgimento della procedura.

Pt	Tumore primitivo ER/PR/HER2	Metastasi ER/PR/HER2	CTC/7,5 mL di sangue	CTC ER ⁺ (%)	CTC HER2 ⁺ (%)	CTC Vimentina ⁺ (%)	CTC ALDH1 ⁺ (%)
1	+/+/-	+/-/-	8580	49	2	21	17
2	-/-/-	-/-/-	0	-	-	-	-
3	-/-/+	N.A.	630	0	100	75	0
4	+/+/-	+/+/-	0	-	-	-	-
5	+/+/-	+/+/-	63	0	0	100	0
6	+/+/-	+/+/-	333	42	100	67	40
7	+/+/-	N.A.	0	-	-	-	-
8	+/+/-	+/+/-	103	0	0	0	0
9	-/-/-	-/-/-	0	-	-	-	-
10	-/-/-	N.A.	18	0	0	100	0
11	+/-/-	-/-/-	10	0	50	80	40
12	-/-/+	N.A.	13	0	75	20	0
13	+/-/-	+/-/-	14	0	0	50	0
14	+/+/-	N.A.	0	-	-	-	-
15	+/+/-	+/+/-	6	25	0	100	0
16	+/+/+	N.A.	0	-	-	-	-
17	+/+/-	N.A.	1	50	0	0	0
18	+/+/-	N.A.	2	100	0	0	50
19	-/-/-	-/-/-	0	-	-	-	-

Tabella 4: Risultati.

1) Profilo recettoriale del tumore primitivo e delle lesioni metastatiche (quando disponibili).

Dall'analisi del *profilo recettoriale del tumore primitivo* delle 19 pazienti abbiamo tratto i seguenti dati:

- Presenza di espressione di ER (ER+) in 13 pazienti su 19 (68,4%)
- Presenza di espressione di PgR (PgR+) in 11 pazienti su 19 (57,9%)
- Presenza di espressione di HER-2 (HER-2+) in 3 pazienti su 19 (15,8%)

Dall'analisi del *profilo recettoriale delle lesioni metastatiche* di 11 delle 19 pazienti (58,1%), sono stati ricavati i seguenti risultati:

- Presenza di espressione di ER (ER+) in 7 pazienti su 11 (63,6%)
- Presenza di espressione di PgR (PgR+) in 5 pazienti su 11 (45,4%)
- Presenza di espressione di HER-2 (HER-2+) in nessuna delle 11 pazienti

2) Numerosità e caratteristiche molecolari delle CTC isolate dal sangue periferico delle pazienti incluse nella popolazione oggetto di studio.

Le CTC sono state isolate in 12 pazienti su 19 (63,2%). La numerosità delle CTC identificate nei campioni è risultata molto variabile, con valori compresi tra 1 e 8580 per 7,5 mL di sangue periferico. In particolare, sono state individuate:

- 1<CTC<20: 7 pazienti su 12(58,3%);
- 21<CTC<350: 3 pazienti su 12 (25%);
- 351<CTC<9000: 2 pazienti su 12 (16,7%).

In merito all'analisi dei marcatori studiati, le CTC isolate hanno evidenziato il seguente profilo molecolare:

- 5 pazienti su 12 (40%) presentavano positività per ER (ER+), con una percentuale di espressione recettoriale variabile tra il 25 e il 100%.
- 5 pazienti su 12 (40%) presentavano positività per HER-2 (HER-2+), con una percentuale di espressione recettoriale variabile tra il 50 e il 100% (eccetto una paziente con espressione recettoriale al 2%).
- 9 pazienti su 12 (75%) presentavano positività per la Vimentina, con percentuale di espressione molecolare variabile tra il 21 e il 100%.

- 4 pazienti su 12 (33%) presentavano positività per ALDH1 (ALDH1+), con percentuale di espressione molecolare variabile tra il 17 e il 50%.



Figura 5: Immagine di CTC ERBlue = DAP



Figura 6: Immagine di CTC ER+
Blue = DAPI; Rosso = ER

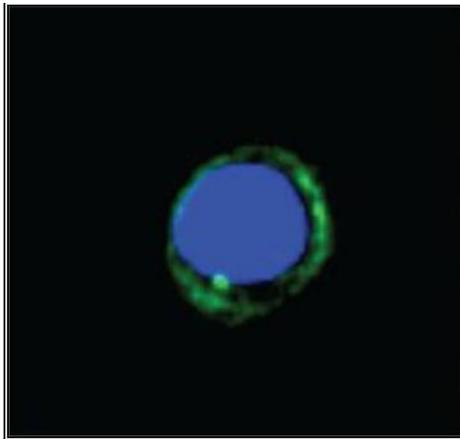


Figura 7: Immagine di CTC HER2+
Blue = DAPI; Verde = HER2

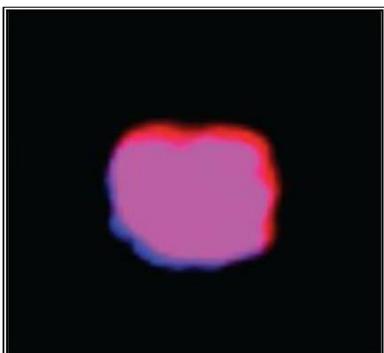


Figura 8 e 9:
Immagine di CTC Vimentina+
Blue = DAPI; Rosso = Vimentina

3) Confronto tra il profilo recettoriale delle CTC e quello espresso dalla lesione metastatica.

Dall'analisi molecolare delle lesioni metastatiche delle 11 pazienti di cui si possiedono i campioni e i relativi dati, è stato evidenziato che, delle 7 pazienti ER+ sulla lesione metastatica, solo 3 di esse conservano l'espressione recettoriale di ER (pt 1, 6 e 15). In due dei casi citati (1 e 6), inoltre, la percentuale di espressione molecolare risulta elevata (rispettivamente 49 e 42%).

Il recettore HER-2, al contrario, è risultato negativo nel campione di lesione metastatica in tutte le 11 pazienti che lo presentavano. Tuttavia, le pazienti 1, 6 e 11 risultano HER-2+ all'analisi dell'espressione recettoriale delle CTC, nonostante la negatività di HER-2 sulla lesione metastatica. Inoltre, tali CTC sono caratterizzate anche una positività alla vimentina (variabile tra il 21 e l'80%) e al ALDH1 (variabile tra il 17 e il 40%). La numerosità delle CTC in queste 3 pazienti è estremamente variabile, andando da 10 a 8580.

4) Confronto tra il profilo recettoriale delle CTC e quello espresso dal tessuto neoplastico primitivo.

Dall'analisi molecolare delle CTC, si è ricavato che, su 13 pazienti positive per ER nel tumore primitivo, in 4 di esse (31%, pt 5, 8, 11 e 13) è stata *persa l'espressione del recettore per gli estrogeni (ER-)*. In 3 delle 4 pazienti (5, 8 e 13) la positività per ER è conservata anche sulla lesione metastatica. La vimentina risulta elevata nelle pazienti 5, 11 e 13 (tra il 50 e il 100%), mentre essa è negativa nella paziente 8. Al contrario, ALDH1 è espresso solo dalla paziente 11 (l'unica che presenta negatività per ER anche nelle localizzazioni metastatiche), con una percentuale del 40%. La numerosità delle CTC è rilevante e varia da valori di 10 fino a 103 cellule. L'analisi ha evidenziato, inoltre, una *positività per HER-2 sulle CTC isolate da 3 pazienti con profilo recettoriale HER-2- nel tumore primitivo* (19%, pt 1, 6 e 11). Le 3 pazienti risultano, inoltre, HER-2- nelle lesioni

metastatiche, Vimentina+ in percentuale variabile tra il 21 e l'80% e ALDH1+ tra il 17 e il 40%. La numerosità delle CTC isolate nelle 3 pazienti è compresa tra 10 e 8580 cellule.

Risultati preliminari su tecniche di coltura *in vitro* di CTC.

Parallelamente agli studi molecolari sulle CTC prelevate dalle pazienti con carcinoma mammario avanzato, abbiamo predisposto ed eseguito esperimenti preliminari al fine di identificare le condizioni ideali per la proliferazione e propagazione delle cellule isolate “*ex vivo*”. Tale esigenza nasce dal fatto che le CTC, nel sangue periferico, si ritrovano in numero limitato; di conseguenza, bisogna verificare le diverse condizioni di crescita colturale.

Il primo approccio ha previsto l'utilizzo del normale modello di coltura in aderenza, tuttavia non ha portato a risultati favorevoli.

Gli esperimenti successivi sono stati eseguiti mediante un modello di “non aderenza”, stimolando la proliferazione di cellule con caratteristiche di staminalità *in vitro*. Tali condizioni, sebbene non inducano la proliferazione cellulare, sono in grado di prolungare la sopravvivenza delle CTC *in vitro*, fino a 3-5 settimane.

Al fine di risolvere tale problematica, è stata pianificata l'esecuzione di co-colture di CTC assieme a cellule di supporto che sostengano la proliferazione delle cellule neoplastiche. Quindi, abbiamo testato un sistema di co-coltura di CTC con fibroblasti mammari.

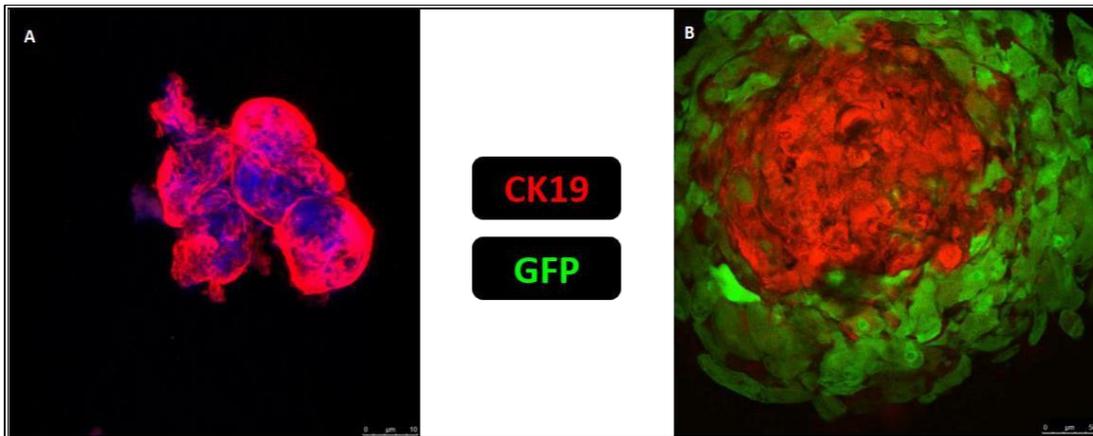


Figura 10: Coltura di CTC in vitro.

A: Aggregato di CTC Citocheratina 19⁺, osservato dopo 3 settimane in assenza di cellule stromali.

B: “Sfera mista” composta da uno strato di proteina fluorescente verde (GFP) che marca fibroblasti ottenuti da mastoplastica riduttiva (RFMs) e un nucleo interno di CTC CK19⁺, osservata dopo 3 settimane di crescita.

Le CTC isolate sono state piastrate in condizioni di “non aderenza” in 24 pozzetti con attacco ultra-basso. Per ciascuna delle condizioni diverse considerate, le CTC sono state risospese in 500 mL di MEBM integrato con B27 al 2%, EGF allo 0,01%, idrocortisone allo 0,01%, insulina allo 0,01%, FGF base allo 0,002% e gentamicina allo 0,01%; tale metodica è risultata efficace nell’indurre la crescita delle cellule tumorali sotto forma di *mammosfere*. In seguito, sono state confrontate tali condizioni di coltura:

- Coltura delle sole CTC.
- Coltura di cellule CD45-positive (leucociti) da sole (controllo).
- Co-coltura diretta di CTC con cellule stromali.
- Co-coltura diretta di cellule CD45-positive con cellule stromali (controllo)
- Coltura delle sole cellule stromali (controllo).

Tutte le colture sono state integrate ogni 3 giorni con 300 mL di mezzo fresco e mantenute in un incubatore cellulare a 37°C con un ambiente al 5% di CO₂, per un totale di 3-5 settimane. Al termine di questo periodo, le CTC sono state raccolte e avviate per la propagazione in vivo e in vitro per “esperimenti terapeutici”. L’immunofluorescenza è stata eseguita utilizzando un microscopio confocale per una migliore definizione delle

interazioni fisiche tra CTC e le cellule stromali. Inoltre, al fine di distinguere facilmente i due tipi cellulari, queste ultime sono state trasdotte con vettori lentivirali che trasportano GFP, le altre invece con proteina fluorescente rossa (RFP).

Attualmente stiamo testando in parallelo varie condizioni di co-cultura:

- Fibroblasti, ottenuti da mastoplastica riduttiva (RMFs).
- Cellule stromali *cancro-associate* ottenute dalla dissociazione dai tumori primitivi, considerando il fenotipo di partenza.
- Cellule mesenchimali staminali o cellule progenitrici adipocitarie.

Inoltre, stiamo testando il ruolo dell'aggiunta di determinate citochine e ormoni, come l'IL-6, l'IL-8, l'adiponectina, il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), il fattore di crescita dell'epidermide (EGF), il fattore di crescita insulino-simile (IGF), l'insulina e gli ormoni steroidei (estrogeni). In particolare, stiamo esaminando l'eventuale facilitazione della proliferazione delle CTC da parte di tali fattori.

CAPITOLO V

DISCUSSIONE

1. Discussione

Il recettore degli estrogeni e la proteina HER-2 sono due importanti fattori prognostici nel carcinoma mammario. La perdita dell'espressione dell'ER che abbiamo osservato nelle CTC indica l'esistenza di una “*de-differenziazione tumorale*”, che conduce allo sviluppo di una neoplasia più aggressiva e con notevoli capacità di invasione.

A confermare tale visione, concorrono diversi fattori:

- Livelli elevati di vimentina espressi dalla maggior parte (75%) delle pazienti presentanti CTC nel sangue periferico. Inoltre, la vimentina risulta espressa in percentuale rilevante nelle CTC ER-.
- Positività per ALDH1, enzima detossificante presente fisiologicamente nelle cellule staminali; la presenza di tale proteina porta a *multi drug resistance*.

La perdita di “*identità recettoriale*” (tra CTC e tumore primitivo) del recettore ER giustificherebbe *l'insorgenza della resistenza al trattamento ormonale* e la comparsa di progressione tumorale.

La positività delle CTC al recettore HER-2, associata alla negatività di tale proteina nel tumore primitivo, rinforza l'ipotesi secondo cui la neoplasia attiva vie di trasduzione del segnale alternative di natura proliferativa. Ciò porterebbe alla resistenza nei confronti del trattamento in atto, che risulterebbe inadatto a bloccare tali nuovi pathway.

Le differenti caratteristiche rilevate paragonando il tumore primitivo, le localizzazioni metastatiche e le CTC confermano l'eterogeneità tumorale quale elemento intrinseco al processo di tumorigenesi; la ricerca volta alla comprensione di tale processo è

fondamentale, quindi, per analizzare la progressione neoplastica e le cause del fallimento terapeutico.

Da queste e altre evidenze, si comprende come nel corso delle neoplasie si selezionino una sottopopolazione cellulare di natura mesenchimale e staminale, resistenti a molteplici trattamenti. Esse sarebbero quindi responsabili della progressione tumorale e dell'insorgenza delle metastasi.

L'esistenza delle CTC, facilmente individuabili con un semplice prelievo ematico, offre un possibile target di terapia al clinico. Allo stesso tempo, la biopsia liquida permette di monitorare la dinamicità tumorale mediante una procedura miniminvasiva e riproducibile nel tempo.

2. Conclusioni e prospettive future

I risultati preliminari del nostro studio evidenziano come le CTC costituiscano un modello innovativo adatto alla scelta di approcci terapeutici antitumorali su base individuale. Tali strategie non si limitano a caratterizzare il profilo molecolare del solo tumore primitivo, bensì si rivolgono all'analisi delle metastasi e della neoplasia in toto, adattandosi alla dinamicità propria del processo tumorale.

Le prime evidenze provenienti dagli esami colturali indicano che le cellule tumorali circolanti potrebbero condurre allo sviluppo di *modelli preclinici* che rappresentino la "firma" del tumore e consentano di sperimentare approcci terapeutici individualizzati. L'obiettivo del nostro studio è quello di identificare condizioni di coltura ottimali al fine di supportare la proliferazione e propagazione delle cellule tumorali, riproducendo il microambiente e gli stimoli autocrini e paracrini che ne sostengono la crescita.

I progetti futuri prevedono di mimare la formazione di nicchie cellulari delle più frequenti localizzazioni metastatiche del carcinoma mammario, utilizzando una combinazione di cellule "specializzate" (ad es. epatociti e osteoblasti) e piattaforme acellulari. Tale procedura sarebbe finalizzata allo studio e comprensione dei meccanismi di interazione

delle cellule tumorali con il microambiente, in modo da testare nuovi approcci terapeutici.

L'isolamento, la determinazione quantitativa e l'analisi qualitativa delle CTC consentiranno, in futuro, di utilizzare un nuovo criterio di stratificazione dei pazienti, differenziando tumori ad alto e basso rischio, a buona e cattiva prognosi e quelli con più elevato rischio di recidiva e progressione.

La prospettiva futura è quella di intraprendere studi clinici “*biomarker driven*”, in cui le CTC rappresenterebbero un elemento innovativo, utile per monitorare e predire in tempo reale la risposta alla terapia intrapresa, in base alle caratteristiche molecolari delle cellule isolate.

Tale approccio consentirebbe, nei prossimi anni, di applicare appieno il concetto teorico alla base della medicina di precisione.

Bibliografia

1. I numeri del cancro in Italia 2017. AIOM-AIRTUM. Tratto da www.aiom.it
2. Radvin PM, Cronin KA, Howlader N, et al. *The decrease in breast cancer incidence in 2003 in United States*. N Engl J Med 2007; 356:1670-4.
3. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from Women's Health Initiative randomized controlled trial*. JAMA 2002; 288:321-33.
4. Crocetti E, Buzzoni C, Falcini F, et al. *Disentangling the roles of mammographic screening and HRT in recent breast cancer trends in Italy by analyses based on calendar time and time since screening activation*. Breast J 2010; 16:350-5.
5. Lakhani S, Ellis IO, Schnitt SJ et al., editors. WHO classification of tumours of the breast. Fourth edition. IARC: Lyon 2012.
6. Burstein HJ et al., *Ductal carcinoma in situ of the breast*. N Engl Med 350:1430,2004.
7. S. W Duffy, A. Dibden, D. Michalopoulos et al., *Screen detection of ductal carcinoma in situ and subsequent incidence of invasive interval breast cancers: a retrospective population-based study*. The Lancet Oncology VOL. 17, NO. 1 pag. 109-114, January 2016.
8. Ermand A. Rakhs, Maysa E., El-Sayed etc al., *Prognostic significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma*. J Clin Oncol 2008 26 (19) 2008: 3153-3157.
9. Rajesh Kanna Nandagopal Radha, Viswanathan P et al., *Histopathology and Prognostic Indices of Carcinoma Breast with Special Reference to p53 Marker*. J Clin Diagn Res. 2014 Jul; 8(7).

10. Dunnwald LK, Rossing et al., *Hormone Receptor Status, tumor characteristics and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients*. Breast Cancer Res 2007;9: R6.
11. Flouriot, G. et al., *Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1*. EMBO J 19, 4688-4700 (2000).
12. Ascenzi, P., Bocedi, A. & Marino, M., *Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health*. Mol Aspects Med 27, 299-402 (2006).
13. Nilsson, S. et al., *Mechanisms of estrogen action*. Physiol Rev 81, 1535-1565 (2001).
14. Osborne CK et al., *Steroid hormone receptors in breast cancer management*. Breast Cancer Res Treat. 1998;51:227-38.
15. Gutierrez C et al., *HER2: biology, detection and clinical implications*. Arch Pat Lab Med 135: 55-62, 2011.
16. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science 1987;235(4785):177-82.
17. Gancberg D, Järvinen T, di Leo A, Rouas G, Cardoso F, Paesmans M, et al., *Evaluation of HER-2/neu protein expression in breast cancer by immunohistochemistry: an interlaboratory study assessing the reproducibility of HER-2/neu testing*. Breast Cancer Res Treat 2002;74: 113-20.
18. Layfield LJ, Wallander ML, Tripp SR, Redpath S, Banks PM., *Comparison of Dual-ISH (DISH) With Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Correlation With Immunohistochemical Findings for HER2/Neu Status in Breast Carcinoma*. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2017 Apr;25(4):231-236.
19. Salmon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med 344:783-792, 2001.

20. Van de Vijver MJ¹, He YD, van't Veer LJ, et al., *A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer*. N Engl J Med. 2002 Dec 19;347(25):1999-2009.
21. Sorlie T, Perou Cm, Tibshirani R, et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 10869-10874, 2001.
22. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al., *Ki67 Index, HER-2 Status, and Prognosis of Patients with Luminal B Breast Cancer*. J Natl Cancer Inst 2009 May 20; 101(10):736-50.
23. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H., *Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse*. J Clin Oncol. 28(10):1684-91, 2010.
24. Yanagawa M, Ikemot K, Kawauchi S, et al., *Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype*. BMC Res Notes. 2012;5: 376.
25. Carey LA., *Directed Therapy of Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer*. Oncologist 2010; 15: 49-56.
26. Prat, A., et al., *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. 12(5): p. 68.
27. Manna S. and K.Holz M., *Tamoxifen Action in ER-Negative Breast Cancer*. Signal Transduction Insights 2016: 5 pag. 1-7.
28. Collignon J, Lousberg L, Schroeder H, Jerusalem G et al., *Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions*. Breast Cancer 2016, Volume 8, pag. 93-107.
29. Edge SB, Byr DR, Compton CC, et al., *American Joint Committee on cancer (AJCC). Cancer Staging manual. Seventh edition*. New York, Springer 2009.
30. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M, Marubini E. *Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving*

surgery with radical mastectomy for early breast cancer. N Engl J Med. 2002 Oct 17;347(16):1227-32.

31. C.E. Swenson, W.R. Perkins, P. Roberts, A.S. Janoff. *Liposome technology and the development of Myocet™ (liposomal doxorubicin citrate).* The Breast Volume 10, Supplement 2, June 2001, Pages 1-7.

32. Harris L, Batist G, Belt R, Rovira D, Navari R, Azarnia N, Welles L, Winer E. *Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma.* Cancer. 2002 Jan 1;94(1):25-36.

33. Stephen E. Jones, Michael A. Savin, Frankie Ann Holmes, Joyce A. O'Shaughnessy., *Phase III Trial Comparing Doxorubicin Plus Cyclophosphamide with Docetaxel Plus Cyclophosphamide as Adjuvant Therapy for Operable Breast Cancer.* J Clin Oncol 2006 24:5381-5387.

34. Vogel Vg, Costantino JP, Wickerham DL, et al., *Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes. Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial.* JAMA 2006; 295:32: 2727-2741.

35. Monhollen L. Morrisen C, Ademuyiwa FO, et al., *Pleomorphic lobular carcinoma: a distinctive clinical and molecular breast cancer type.* Histopathology 2012; 61: 365-377.

36. Murray L, Reintgen M, Akman K, et al., *Pleomorphic lobular carcinoma in situ: treatment options for a new pathologic entity.* Clin Breast Cancer 2012; 12: 76-79.

37. Margolese RG, Cecchini RS, Julian TB, et al., *A clinical trial of anastrozole (A) versus tamoxifen (tam) in postmenopausal patients with DCIS undergoing lumpectomy plus radiotherapy.* J Clin Oncol 33, 2015 (suppl; abstr LBA500).

38. Goss PE, Ingle JN, Alés-Martinez JE, et al., *Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women.* N Engl J Med 2011; 364: 2381-2391.

39. Fisher ER, Land SR, Fisher B, et al., *Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: twelve-year observations concerning lobular carcinoma in situ*. *Cancer* 2004; 100: 238-244.
40. Lee CI, Goodwin A, Wilcken N. *Fulvestrant for hormone-sensitive metastatic breast cancer*. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Jan 3;1:CD011093. doi: 10.1002/14651858.CD011093.pub2.
41. The BIG 1-98 Collaborative Group. *Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer*. *New Engl J Med* 2009; 361: 766-776
42. The Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) Trialists' Group, et al., *Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial*. *Lancet Oncol*, 2008; 9: 45-53.
43. Fornier M, Risio M, Van PC, et al., *Her2 testing and correlation with efficacy of trastuzumab therapy*. *Oncology* 2002; 16: 1340.
44. Viani G, Alfonso S, et al., *Adjuvant trastuzumab in the treatment of HER2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials*. *BMC Cancer* 2007; 7: 153.
45. Vogel, C.L., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., et al., *Efficacy and safety of Trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer*. *J. Clin. Oncol.* 21: 719-26, 2002.
46. Baselga J, Cortes J, Kim SB, et al., *Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer*. *N Engl J Med* 2012; 306: 109-119.
47. Ahmed, N., et al., *Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2010. 10(3): p. 268-78.
48. Monteiro, J. and R., Fodde., *Cancer stemness and metastasis: therapeutic consequences and perspectives*. *Eur J Cancer*, 2010. 46(7): p. 1198-203.

49. Hay, E.D., et al., *Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced*. Am J Kidney Dis, 1995. 26(4): p. 678-90.
50. Perez-Pomares, J.M., et al., *Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs)*. Dev Biol, 2002. 247(2): p. 307-26.
51. Gupta, G.P. and J., Massague., *Cancer metastasis: building a framework*. Cell, 2006. 127(4): p. 679-95.
52. Blick, T., et al., *Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines parallel the CD44(hi/) CD24(lo/-) stem cell phenotype in human breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010.15(2): p.235-52.
53. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano., *Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis*. Int J Dev Biol, 2004. 48 (5-6): p. 365-75.
54. Maeda, M., K.R. Johnson, and M.J. Wheelock., *Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition*. J Cell Sci, 2005. 118 (Pt 5): p. 873-87.
55. Gavert, N. and A. Ben-Ze'ev., *Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors*. Trends Mol Med, 2008. 14(5): p. 199-209.
56. Fidler IJ et al., *Selection of successive tumor lines for metastasis*. Nature New Biol. 1973; 242: 148-149.
57. Weiss L, Holmes JC, Ward PM., *Do metastases arise from pre-existing subpopulation of cancer cells?* Br J cancer 1983; 47: 81-88.

58. Pantel K, Brakenhoff RH., *Dissecting the metastatic cascade*. Nature Cancer Reviews 2004; 4: 448-455.
59. Braun S, Pantel K, Müller P, et al., *Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer*. N Engl J Med. 2000; 342(8): 525-33.
60. Bernards R, Weinberg RA., *A progression puzzle*. Nature 2002; 418(6900):823-24.
61. Woelfle U, Cloos J, Sauter G, Riethdorf L, et al., *Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer*. Cancer Res. 2003 Sep 15;63(18):5679-84.
62. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al., *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature. 2002 Jan 31;415(6871):530-6.
63. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, et al., *Metastatic behavior of breast cancer subtypes*. J Clin Oncol. 2010 Jul 10;28(20):3271-7.
64. Lin NU, Winer EP. *Brain metastases: the HER2 paradigm*. Clin Cancer Res. 2007 Mar 15;13(6):1648-55.
65. Amir E, Miller N, Geddie W, Freedman O, et al., *Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer*. J Clin Oncol. 2012 Feb 20;30(6):587-92.

66. Cardoso F, Bedard PL, Winer EP, et al., *International guidelines for management of metastatic breast cancer: combination vs sequential single-agent chemotherapy*. J Natl Cancer Inst. 2009 Sep 2;101(17):1174-81.
67. Gennari A, Stockler M, Puntoni M, et al., *Duration of chemotherapy for metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials*. J Clin Oncol. 2011 Jun 1;29(16):2144-9.
68. Fossati R, Confalonieri C, Torri V, et al., *Cytotoxic and hormonal treatment for metastatic breast cancer: a systematic review of published randomized trials involving 31,510 women*. J Clin Oncol. 1998 Oct;16(10):3439-60.
69. Foulds L., *The experimental study of tumor progression: a review*. Cancer Res. 1954 Jun;14(5):327-39.
70. Heppner GH., *Tumor heterogeneity*. Cancer Res. 1984 Jun;44(6):2259-65.
71. Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP., *Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms*. Science. 1985 Apr 12;228(4696):187-90.
72. Nowell PC., *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science. 1976 Oct 1;194(4260):23-8.
73. Bonnet D, Dick JE., *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med. 1997 Jul;3(7):730-7.
74. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. Nature. 1994 Feb 17;367(6464):645-8.
75. Di Goldthwaite CA., *Are Stem Cells Involved in Cancer?* Tratto da <https://www.nih.gov/>
76. Liu S, Dontu G, Mantle ID, et al., *Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells*. Cancer Res. 2006 Jun 15;66(12):6063-71.
77. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al., *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. Cell StemCell.2007Nov;1(5):555-67

78. Matsui W, Huff CA, Wang Q, et al., *Characterization of clonogenic multiple myeloma cells*. Blood. 2004 Mar 15;103(6):2332-6.
79. Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, et al., *Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 9;105(36):13427-32.
80. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):3983-8.
81. Aleix Prat, Joel S Parker, Olga Karginova, et al., *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer*. Breast Cancer Res. 2010; 12(5): R68.
82. Chute JP, Muramoto GG, et al., *Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Aug 1;103(31):11707-12.
83. Armstrong L, Stojkovic M, et al., *Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity*. Stem Cells. 2004;22(7):1142-51.
84. Hess DA, Meyerrose TE, et al., *Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity*. Blood. 2004 Sep 15;104(6):1648-55.
85. Pearce DJ, Taussig D, et al., *Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples*. Stem Cells. 2005 Jun-Jul;23(6):752-60.
86. Lim E, Vaillant F, Wu D, et al., *Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers*. Nat Med. 2009 Aug;15(8):907-13.
87. Boecker W, Buerger H., *Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept*. Cell Prolif. 2003 Oct;36 Suppl 1:73-84.
88. Diaz LA Jr, Bardelli A., *Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA*. J Clin Oncol. 2014 Feb 20;32(6):579-86.
89. Harouaka R, Kang Z, Zheng SY, Cao L., *Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications*. Pharmacol Ther. 2014 Feb;141(2):209-21.

90. Carvalho J, Oliviera C., *Extracellular Vesicles – Powerful Markers of Cancer Evolution*. Front Immunol. 2014; 5: 685.
91. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, et al., *Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov 8;102(45):16368-73.
92. Engell HC., *Cancer cells in the circulating blood; a clinical study on the occurrence of cancer cells in the peripheral blood and in venous blood draining the tumour area at operation*. Acta Chir Scand Suppl. 1955; 201:1-70.
93. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, et al., *Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases*. Am J Pathol. 1998 Sep;153(3):865-73
94. Giuliano M, Herrera S, Christiny P, et al., *Circulating and disseminated tumor cells from breast cancer patient-derived xenograft-bearing mice as a novel model to study metastasis*. Breast Cancer Res. 2015 Jan 9; 17:3.
95. Ghossein RA, Bhattacharya S., *Molecular detection and characterization of circulating tumor cells and micrometastases in prostatic, urothelial, and renal cell carcinomas*. Semin Surg Oncol. 2001 Jun;20(4):304-11.
96. Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, et al., *Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer*. Cancer Cell. 2005 Sep;8(3):227-39.
97. Gangnus R, Langer S, Breit E, et al., *Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients*. Clin Cancer Res. 2004 May 15;10(10):3457-64.
98. Hoffmann AC, Warnecke-Eberz U, Luebke T, et al., *Survivin mRNA in peripheral blood is frequently detected and significantly decreased following resection of gastrointestinal cancers*. J Surg Oncol. 2007 Jan 1;95(1):51-4.
99. Solakoglu O, Maierhofer C, Lahr G, et al., *Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Feb 19;99(4):2246-51.
100. Méhes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF., *Circulating Breast Cancer Cells Are Frequently Apoptotic*. Am J Pathol. 2001 Jul; 159(1): 17–20.
101. Ring A, Smith IE, Dowsett M., *Circulating tumour cells in breast cancer*. Lancet Oncol. 2004 Feb;5(2):79-88.

102. Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, et al., *Circulating nucleosomes in serum*. Ann N Y Acad Sci. 2001 Sep; 945: 93-102.
103. Sorenson GD, Porter DM, Barth RJ, et al. *Detection of mutated KRAS2 sequences in plasma from patients with pancreatic carcinoma in comparison with the Ca19-9 assay*. J Int Soc Oncodev Biol Med 1997; 18:66.
104. Schmitt M, Foekens JA., *Circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients assessed by a novel RT-PCR test kit and comparison with status of bone marrow-disseminated tumor cells*. Breast Cancer Res. 2009; 11(5): 109.
105. Agrawal B, Krantz MJ, Parker J, Longenecker BM., *Expression of MUC1 mucin on activated human T cells: implications for a role of MUC1 in normal immune regulation*. Cancer Res. 1998 Sep 15;58(18):4079-81.
106. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al., *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. N Engl J Med. 2004 Aug 19;351(8):781-91.
107. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, et al., *Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy*. Clin Cancer Res. 2004 Dec 15;10(24):8152-62.

