

s.c. Oncologia medica C

Splenic Marginal Zone Lymphoma (SMZL): caratterizzazione di subset fondata su marcatori cellulari e molecolari e identificazione della cellula di origine

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

Responsabile scientifico: Manlio Ferrarini

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Daniele Reverberi

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: linfoma splenico della zona marginale; marker diagnostici; subsets; diagnosi differenziale; linfociti B

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Anatomia e citoistologia patologica (M. Truini, S. Salvi, L. Ottaggio, A. Zunino, S. Viaggi, G. Anselmi); s.s. Diagnostica molecolare (S. Zupo, G. Cutrona, G. Cerruti, M. Megna)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: diagnostica

Soggetti cofinanziatori: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro; GISL

Background

Nell'ultima classificazione WHO dei tumori del sistema linfoide ed emopoietico, il linfoma splenico della zona marginale (SMZL) è definito, come una entità patologica indipendente che origina da cellule B mature periferiche. Il SMZL è un tumore raro che rappresenta meno del 2% dei linfomi a piccole cellule. La definizione di SMZL si basa principalmente su alcune caratteristiche clinico-patologiche generali, che includono splenomegalia, accumulo di linfociti B (con morfologia e caratteristiche fenotipiche simili ai linfociti B normali della zona marginale) nella milza, midollo e sangue periferico; ha generalmente un andamento indolente, che può tuttavia essere caratterizzato da citopenia, a volte severa. Nonostante alcune caratteristiche comuni, vi sono alcune criticità diagnostiche evidenziate nella classificazione WHO che suggeriscono che il SMZL comprenda in realtà diverse sub-entità. Queste indicazioni trovano supporto nella recente descrizione della eterogeneità fenotipica e funzionale sia delle cellule normali della zona marginale della milza che delle cellule delle aree equivalenti della zona marginale (cellule B dell'area sub-capsulare dei linfonodi, della zona sottoepiteliale delle placche di Peyer e dell'area sub-epiteliale delle tonsille). Le cellule della MZ o MZ equivalente comprendono infatti cellule IgM ++, IgD+/- specializzate in risposte T-indipendenti verso antigeni polisaccaridici dei batteri, che si pensa proliferano in situ nella MZ, ma anche cellule IgG e IgA. Una simile eterogeneità è stata descritta per le cellule maligne del linfoma splenico della zona marginale sia a livello fenotipico (sono generalmente CD20+, CD22+, CD24+, CD27+, FMC7 +, CD79b++, CD10-, mentre altri marcatori come CD23 e CD5 sono variabili), molecolare (in certi casi il clone neoplastico utilizza per esempio segmenti genici IGH VDJ mutati, in altri casi i geni IGHV sono in configurazione germ line) e citogenetico (le più frequenti aberrazioni genetiche sono sul 3q e 12 q con guadagno di materiale genetico e delezione sul 7q22-36). L'eterogeneità dei pazienti e l'impossibilità di classificare al presente questa eterogeneità con precisione potrebbe spiegare i risultati piuttosto inconclusivi di un certo numero di trial clinici nei quali veniva valutato il trattamento dei pazienti affetti da SMZL con varie combinazioni di farmaci chemioterapici-immunoterapici. Inoltre, la risposta alla terapia e la durata di remissione sono le variabili maggiori e la splenectomia rimane l'approccio terapeutico più ampiamente usato nella corrente pratica clinica, nonostante i rischi connessi alla procedura chirurgica e al fatto che essa rappresenta una non definitiva opzione di cura.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

I maggiori problemi con il SMZL derivano dall'aspetto eterogeneo della patologia connessa alla differente origine cellulare e alle differenti caratteristiche del clone neoplastico nelle diverse forme di SMZL. Al fine di raggiungere una classificazione di queste rare entità patologiche, ci si propone di:

- definire le varianti del SMZL basandosi su criteri cellulari, molecolari e genetici
- determinare la cellula di origine del SMZL e delle sue varianti basata su un'accurata analisi fenotipica e sullo studio del repertorio genico usato dalle cellule neoplastiche e dalle corrispondenti normali.
- analizzare l'espressione genica (GEP) del SMZL e delle sue varianti confrontandola con i profili genici delle cellule della controparte normale.

Tutti questi approcci sono stati ampiamente utilizzati nei nostri laboratori in passato per le CLL ed hanno fornito importanti informazioni sull'eterogeneità di questa malattia. Questi studi verranno condotti in parallelo sulle cellule B della MZ e della zona equivalente della MZ di altri tessuti linfoidei, per ottenere significative correlazioni sul potenziale legame progenitore-effettore tra le cellule normali e le cellule neoplastiche. Il nostro gruppo di ricerca ha acquisito in tal senso una considerevole esperienza nella separazione e caratterizzazione delle diverse sottopopolazioni di cellule B normali.

Infine, i risultati di questi studi potranno delineare lo spettro di eterogeneità del linfoma SMZL e portare alla definizione di varianti caratterizzate da differenti proprietà delle cellule maligne che includono il fenotipo di superficie identificato con anticorpi monoclonali, il repertorio genico del gene IGHV, l'origine cellulare della cellula maligna e possibilmente anche il profilo genico. Questi studi potranno condurre all'identificazione di un limitato numero di marker

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

molecolari e cellulari capaci di distinguere le varianti della malattia. Stiamo collaborando con un network nazionale ed europeo che permetterà di accedere sia a materiale patologico conservato che a campioni freschi provenienti da trial clinici. Questo renderà possibile avere accesso ad una coorte di pazienti sufficientemente ampia per definire le distinte entità patologiche e rianalizzare alcuni trial clinici già conclusi, con una nuova stratificazione dei pazienti, basandosi su caratteristiche cellulari/molecolari sopra riportate.

Impatto assistenziale certo o potenziale

I maggiori problemi connessi al SMZL riguardano la diagnosi clinico-patologica e la classificazione. Questi problemi sono già descritti nell'ultima classificazione WHO che evidenzia una serie di criticità nella definizione classica di linfoma splenico della zona marginale. Inoltre questa classificazione include patologie spleniche che sono considerate "provvisorie" e comprendono "la variante del linfoma/leucemia splenico B inclassificabile, linfoma splenico diffuso a piccoli linfociti B della polpa rossa, una variante della hairy cell leukaemia". Queste patologie possono invece essere correlate al linfoma splenico della zona marginale. L'approccio qui proposto può aiutare a riclassificare tutte queste diverse forme patologiche su base "cellulare" che include la definizione di cellula di origine. Inoltre, questo studio può offrire nuovi mezzi per un approccio diagnostico semplificato estendibile alla routine di un laboratorio di patologia. Questo studio non solo ha il potenziale di portare risultati di valore concettuale, ma ha anche una importanza pratica. Data l'imprecisione nella diagnosi e classificazione del linfoma splenico, la terapia è infatti basata largamente su approcci tradizionali "empirici". Inoltre i trial clinici finora condotti con chemioterapie e immunoterapie hanno dato risultati insoddisfacenti, principalmente dovuti all'eterogeneità dei pazienti inclusi nello studio. Con una nuova modalità di classificazione sarà possibile definire delle linee guida per le terapie. Inoltre, i risultati dei vecchi trial saranno analizzati retrospettivamente alla luce di una nuova classificazione e nuovi trial dovranno tener conto di questa eterogeneità della malattia.

Risultati e prodotti 2010

Il linfoma splenico della zona marginale è una neoplasia delle cellule B che presenta spesso una manifestazione leucemica. L'immunoistochimica mostra che le cellule del linfoma splenico sono positive per CD5, CD20 e BCL2 e negative per CD10, CD3, ciclina D1, BCL6. Il linfoma splenico della zona marginale esprime geni V della catena pesante delle immunoglobuline che possono essere mutati e non mutati. La presenza di mutazione sul gene V non ha tuttavia diversamente dalla leucemia linfatica cronica un valore prognostico.

La cellula memoria residente nella zona marginale della milza viene considerata la possibile cellula di origine del linfoma splenico della zona marginale.

In questo senso i nostri studi si sono focalizzati sulla definizione della cellula della zona marginale da un punto di vista fenotipico e molecolare.

Le cellule di 5 milze normali, asportate da pazienti con patologie oncologiche per esigenze chirurgiche, sono state colorate in parte al citofluorimetro e in parte utilizzate per l'allestimento di sezioni che sono state colorate mediante immunoistochimica e al microscopio confocale.

I risultati di queste analisi hanno evidenziato che la zona marginale è rappresentata da una popolazione eterogenea. Circa un terzo delle cellule presenti sono IgDlow, IgM bright, mentre la restante parte è rappresentata da cellule memoria IgG e IgA.

Il CD27 è espresso dalla maggior parte delle cellule IgM positive, ma sono presenti anche IgM-positive CD27 negative. Più omogenei appaiono altri marcatori quali la negatività del CD23 e del CD38 e la positività del CD21, CD22 e CD24. BCL6 è negativo nella zona marginale mentre è espresso sebbene in maniera variabile da milza a milza, nei centri germinativi.

La conoscenza dei marcatori in immunoistochimica è stata poi utilizzata per poter identificare e isolare le popolazioni al citofluorimetro per successivi studi molecolari.

I dati del repertorio IGHVDJ della popolazione della zona marginale e del centro germinativo ottenuti lo scorso anno mediante FACS Sorting di 4 milze, sono state completate con lo studio del IGH VDJ espresso dalle cellule della zona marginale e dal centro germinativo isolate da fettine di milza congelata mediante microdissezione al microscopio.

L'RNA è stato poi retrotrascritto amplificato mediante PCR per i geni della famiglia IGHV1 e IGHV4 e clonato mediante l'uso di vettori.

I risultati della microdissezione confermano che le cellule isolate mediante sorting appartengono proprio alla regione anatomica della zona marginale. Inoltre anche dalla microdissezione è stato possibile evidenziare la presenza di diversificazione intraclonale in situ, segno di una stimolazione antigenica in loco.

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Dati recenti hanno riportato che nel linfoma splenico vi è non solo un utilizzo preferenziale di determinati geni IGH V ma anche la presenza di cosiddetti Stereotyped receptors, ossia di segmenti HCDR3 che presentano un alto grado di omologia tra diversi pazienti, che sembrerebbe indicare la presenza di un possibile antigene comune.

Una prima analisi effettuata sulle sequenze da noi ottenute nelle milze normali, aveva evidenziato come la zona marginale, più che il centro germinativo, presenta un numero di sequenze che esprimono HCDR3 molto simili tra di loro (stereotyped).

Questa prima analisi sarà completata con l'inserimento delle nuove sequenze ottenute sulle ultime due milze e con l'inserimento aggiuntivo delle cellule naive della zona del mantello.

I risultati ottenuti saranno quindi confrontati con le sequenze del linfoma splenico presenti nei database pubblici e con i campioni raccolti nel nostro laboratorio al fine di identificare un possibile pattern comune.

Uso dei PNA anti-gene per inibire l'espressione di oncogeni responsabili della crescita delle cellule di linfoma: linfoma centro follicolare

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Programma: c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

Responsabile scientifico: Manlio Ferrarini

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Rosanna Massara

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: Acidi Peptidil Nucleici (PNA); terapia anti-gene; oncogene Bcl2; linfoma centro follicolare (FL); topi SCID

Altre strutture IST partecipanti: s.s. Diagnostica molecolare (G. Cutrona); s.s. Animal facility (M. Cilli); s.c. Trasferimento genico (A. Daga)

Altri Enti coinvolti: Sezione di Biochimica e Centro di Eccellenza per la Ricerca Biomedica, Università degli Studi di Genova (G. Damonte, E. Millo); U.O. Anatomia e Istologia Patologica, ASL 5, La Spezia (S. Roncella, M. Moroni, F. Fedeli)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: MIUR; Ministero della Salute

Background

I PNA (Peptidil Nucleic Acids), omologhi strutturali sintetici degli acidi nucleici, sono inattaccabili dalle nucleasi e formano con il DNA/RNA complementare ibridi più forti e stabili di quelli naturali (DNA/DNA, DNA/RNA). I PNA anti-gene (complementari ad una sequenza genica), se legati ad un vettore nucleare, accedono al nucleo di cellule vitali bloccando la trascrizione del gene bersaglio.

Intendiamo quindi mettere a punto terapie antitumorali basate sull'utilizzo dei PNA anti-gene. Abbiamo già applicato questa strategia al Linfoma di Burkitt (BL) in cui la trasformazione neoplastica è causata dall'iperespressione dell'oncogene c-myc. Utilizzando un PNA specifico per c-myc (PNAmyc), abbiamo dimostrato che è possibile inibire selettivamente l'espressione dell'oncogene nelle cellule BL con conseguente blocco sia della proliferazione cellulare sia dell'apoptosi. PNAmyc però inibisce l'espressione di tutte le forme di myc, che è un gene costitutivo ed un suo uso terapeutico potrebbe quindi danneggiare anche le cellule normali. Dato però che nella maggior parte dei BL la traslocazione cromosomica t(8;14) giustappone l'oncogene c-myc all'enhancer Emu dell'Ig locus (postulato come responsabile della deregolazione e ipertrascrizione del c-myc traslocato) abbiamo disegnato un PNA complementare specifico per la sequenza di Emu (PNAEmu). Si è quindi dimostrato che PNAEmu è in grado di inibire selettivamente e specificamente l'espressione solo di c-myc traslocato. Sulla base dell'efficacia in vitro di PNAEmu, abbiamo iniziato una serie di studi in vivo sul modello animale dei topi SCID in cui sono stati indotti tumori con inoculo di linee cellulari linfomatose umane. In questo sistema modello ne abbiamo valutato i parametri farmacocinetici di biodistribuzione e persistenza nei tessuti e nei tumori nonché l'efficacia antitumorale anche nella forma disseminata del tumore, simile a quella umana.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Ci prefiggiamo di valutare l'efficacia terapeutica del PNAEmu, con sequenza complementare a quella dell'enhancer Emu del locus della catena IgH sul cromosoma 14, già utilizzato con successo nel trattamento del Linfoma di Burkitt in sistemi modello murini, come possibile farmaco a livello genico anche per il trattamento del linfoma centro follicolare (FL)

Infatti anche nel linfoma follicolare, l'oncogene bcl-2 viene traslocato vicino alla sequenza intronica Emu (enhancer dei geni Ig) che regola la trascrizione dei geni delle immunoglobuline (che nelle cellule B avviene a un ritmo elevato). La vicinanza con Emu, a seguito della traslocazione cromosomica, determina una iperespressione dell'oncogene anti apoptotico bcl-2 che codifica per una proteina della membrana mitocondriale BCL-2 che blocca la "programmed cell death" o apoptosi, con conseguente espansione clonale del linfoma follicolare. Il PNAEmu, inibendo efficacemente l'enhancer Emu, dovrebbe essere in grado di provocare il blocco della trascrizione di bcl2 traslocato, con effetti terapeutici a livello genico applicabili alla cura del linfoma follicolare.

Sarà anche valutato il potenziamento terapeutico del PNAEmu in combinazione con farmaci di provata efficacia nel FL e che agiscono attraverso meccanismi totalmente differenti/indipendenti come:

- (in vitro) etoposide/vepeside che inibisce la sintesi del DNA formando un complesso con la topo isomerasi II e il DNA. Questo complesso non solo induce rotture nella doppia elica del DNA ma ne previene il riparo. Il conseguente accumulo della frammentazione del DNA previene l'entrata delle cellule target nella fase mitotica della divisione e porta alla morte cellulare

- (in vivo) ciclofosfamide (una "prodrug" che viene convertita nel fegato nel principio attivo "mostarda di fosforamide") che forma crosslinking fra DNA a doppio filamento (interstrand crosslinkages) e fra i due filamenti del DNA a doppia elica (intrastrand crosslinkages) alla posizione N-7 delle guanine, portando così a morte cellulare

- il rituximab che è un anticorpo monoclonale anti-CD20 (cluster di differenziazione 20), espresso sulle cellule B. Anche se resta poco chiaro l'esatto meccanismo d'azione del farmaco, è stato possibile rilevare che gli effetti combinati conducono all'eliminazione delle cellule B (incluse quelle maligne) dall'organismo, permettendo così lo sviluppo di una nuova popolazione cellulare sana dalle cellule staminali della linea linfoide.

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Impatto assistenziale certo o potenziale

FL è molto diffuso nei paesi industrializzati e per esempio negli USA comprende il 15-20% delle forme non Hodgkin. La maggior parte delle forme di FL sono indolenti con sopravvivenza superiore al 70% a 10 anni, anche senza trattamento, mentre per il 36% i pazienti sono ad alto rischio e spesso resistenti anche alle terapie più recenti ed efficaci (rituximab).

A seguito di questi dati si può evincere l'interesse di mercato del PNAEmu che è specifico per la lesione genica caratteristica di FL e che presenta minore tossicità dei farmaci convenzionali.

Risultati e prodotti 2010

Vista l'efficacia sinergica in vitro dell'accoppiamento di PNAEmu e Vepeside nell'indurre sia il blocco della proliferazione cellulare sia l'apoptosi di cellule FL in coltura, abbiamo avviato gli esperimenti su modello animale per verificarne il potenziale antineoplastico in vivo.

A questo scopo abbiamo messo a punto un modello animale sistemico di linfoma follicolare simile a quello umano, inoculando la linea linfomatosa umana RL nella vena caudale di topi SCID.

Le cellule RL precedentemente transfettate con il gene della luciferasi (RL-luc), in presenza del substrato luciferina, diventano visibili in luminescenza ed è possibile monitorarne la diffusione ed il tropismo verso particolari siti anatomici, in modo non invasivo, grazie alla tecnologia IVIS "imaging system" presente in istituto.

Per stabilire il numero minimo di cellule RL che inducono riproducibilmente FL sistemico e con una cinetica appropriata in tutti i topi inoculati, abbiamo trattato gruppi di 5 topi SCID con quantità crescenti di cellule: $2,5 \times 10^5$, 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 4×10^6 e 6×10^6 . La concentrazione ottimale si è rivelata essere 4×10^6 cellule/topo dato che con questo inoculo (per via caudale) in tutti i topi compaiono i primi segni del tumore dopo 11 giorni e dopo 5 settimane si sviluppa una massa tumorale che comporta sofferenze tali da rendere necessaria la loro soppressione (secondo il protocollo etico). In tutti i topi a 5 settimane oltre alla sintomatologia patologica si è potuto quantificare la crescita del tumore misurata come quantità di bioluminescenza per topo.

La localizzazione delle cellule FL-RL è stata confermata con la necropsia ed immunohistochimica con anticorpi anti CD20 e BCL2. Le cellule di linfoma centro follicolare sono state reperite in particolare nel midollo osseo e a livello delle meningi.

Presentazioni a congressi

Matis S.-Emionite L.-Mariani M.R.-Cutrona G.-Cilli M.-Piccardi F.-Daga A.-Damonte G.-Millo E.-Moroni M.-Roncella S.-Fedeli F.-Boffa L.C.-Ferrarini M.

Innovative Burkitt's Lymphoma therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging.

Simposio AISAL 2010 Imaging e Medicina traslazionale, Imola 4-5 Novembre 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Avendo definito un modello animale per FL, attraverso la determinazione della concentrazione cellulare ottimale per ottenere una crescita tumorale riproducibile e avendo precedentemente dimostrato l'efficacia sinergica in vitro dell'accoppiamento di PNAEmu con Vepeside nell'indurre sia il blocco della proliferazione cellulare sia l'apoptosi di cellule FL in coltura, nel 2011 ci proponiamo di verificare il potenziale antineoplastico in vivo:

a) del PNAEmu come farmaco antineoplastico da solo b) del Vepeside da solo ad una concentrazione che è già stata dimostrata efficace in modelli animali simili c) della combinazione fra PNAEmu e Vepeside a varie concentrazioni, per definire i parametri ottimali non solo per l'efficacia ma anche per la tossicità (LD 50) di tale trattamento.

Una volta ottenuti i dati da questi test pensiamo di poter razionalmente disegnare una strategia terapeutica innovativa e migliorativa per il linfoma follicolare ad alto grado di resistenza basata sull'effetto sinergico della combinazione di PNAEmu e Vepeside.

In seguito si potrà anche valutare il potenziamento terapeutico del PNAEmu in combinazione con altri farmaci di provata efficacia su FL e che agiscono attraverso meccanismi totalmente differenti dall'anti gene PNA.

Ottimizzazione del trattamento della Leucemia Linfatica Cronica (LLC) fondato sulla determinazione di fattori prognostici cellulari e molecolari

Linea di ricerca: 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

Programma: a - Definizione del profilo di rischio individuale in pazienti con neoplasia in fase iniziale o avanzata

Responsabile scientifico: Manlio Ferrarini

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Monica Colombo, Serena Matis, Daniele Reverberi, Rosanna Massara

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: leucemia linfatica cronica; chemio-immunoterapia; marcatori cellulari e molecolari; marcatori cromosomici

Altre strutture IST partecipanti: s.s. Diagnostica molecolare (G. Cutrona, S. Zupo)

Altri Enti coinvolti: Ospedale Maggiore IRCCS, Milano (A. Neri)

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica sperimentale

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro; GISL

Background

La LLC è una malattia eterogenea, nonostante la uniformità di morfologia delle cellule neoplastiche, di presentazione clinica e di decorso iniziale dei pazienti. Infatti, una frazione soltanto dei pazienti (valutabile attorno al 30% circa) progredisce verso gli stadi più avanzati della malattia e la malattia stessa in questa fase assume un decorso ingravescente e spesso mortale, nonostante le cure. I rimanenti pazienti (circa il 70%) tendono a rimanere stabili negli stadi iniziali di malattia e spesso muoiono di cause non correlate alla LLC, che permane agli stadi iniziali. L'atteggiamento terapeutico sinora seguito è stato quello di un attento "wait and see", per cui i pazienti vengono stadati, secondo la metodica di Binet o di Rai, e sono sottoposti a trattamento secondo regole precise, quando la ristadiatione determina una progressione verso lo stadio più avanzato. Questo atteggiamento, universalmente accettato, ha il vantaggio di evitare il trattamento di pazienti con malattia stabile e destinati a non progredire verso gli stadi avanzati, ma crea il problema che i pazienti con tendenza alla progressione vengono probabilmente sottoposti a trattamento in uno stadio più tardivo, quando si è cioè certi dell'aggressività della patologia, nel quale si potrebbe ipotizzare una minor efficacia del trattamento stesso.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'avvento di alcuni marcatori prognostici evidenziati nel passato, anche dal nostro gruppo, ha indicato la possibilità di cambiare l'atteggiamento clinico sovradescritto. Ad esempio, i pazienti, le cui cellule utilizzano geni codificanti per la parte variabile delle Ig "non mutati", ed esprimono CD38 e ZAP-70, hanno un decorso clinico più aggressivo dei pazienti con cellule che utilizzano geni "mutati", e non esprimono CD38 e ZAP-70. Il nostro gruppo ha proposto una metodica di scoring del rischi e ha impostato, nell'ambito del Gruppo Italiano per lo Studio dei Linfomi (GISL), un trial clinico preliminare con l'obiettivo di chiarire se il trattamento precoce di pazienti a rischio determina un miglioramento del DFS e dell'OS. Il presente progetto si propone di ampliare le osservazioni sovraesposte nei modi seguenti:

- determinare un nuovo panel di marcatori che permetta di valutare più accuratamente le probabilità di progressione della LLC. Per questo obiettivo si ricorrerà alle tecniche di gene expression profiling (GEP),
- determinare i rapporti fra espressione dei marcatori cellulari e marcatori citogenetici nel determinare il decorso clinico (e quindi la prognosi) dei pazienti. Il fine ultimo è quello di utilizzare un algoritmo prognostico che faccia uso di combinazioni di diversi marcatori,
- Esplorare in nuovi trials clinici la potenzialità di nuove combinazioni di farmaci. Nel trial clinico attualmente in corso nel GISL i pazienti a cattiva prognosi vengono randomizzati per il trattamento immediato o a progressione con Alemtuzumab (Campath), un anticorpo monoclonale particolarmente efficace contro le cellule di LLC. Tuttavia l'uso di tale anticorpo può indurre complicazioni anche gravi e, come tutte le terapie oggi in uso nella LLC, ha una efficacia relativamente limitata. Pertanto, nella impostazione dei nuovi trials si dovrà considerare sia il trattamento precoce dei pazienti a rischio che il tipo di trattamento con nuovi farmaci (ad es. Bendamustina) o nuovi monoclonali (ad es. CD20 di seconda generazione).

Impatto assistenziale certo o potenziale

In aggiunta ai notevoli risultati concettuali su molecole (marcatori) evidenziabili con GEP, importanti sia nel meccanismo patogenetico della malattia sia nella sua classificazione, il progetto può fornire nuove strategie terapeutiche per la cura della LLC. Nonostante le affermazioni di molti trattati di medicina, la LLC è sia una malattia indolente e a prognosi benigna, ma ciò è vero per circa il 70% dei pazienti soltanto, mentre il rimanente 30% va abbastanza rapidamente incontro a progressione e poi a morte nonostante le attuali terapie, anche le più aggressive come l'auto e anche l'allotrapianto. Pertanto, una razionalizzazione della terapia, sia nel suo timing che nel tipo di farmaci prescelti, ha una valenza molto attuale e necessaria. Ciò è tanto più vero in quanto questi pazienti presentano la malattia a età superiore ai 65 anni, laddove terapie aggressive come megachemioterapie e trapianti sono spesso precluse. D'altra parte, l'atteggiamento attendistico suggerito dalle linee guida attuali, sebbene comprensibile, può facilitare l'accumulo nel clone neoplastico in espansione di alterazioni genetiche capaci di conferire resistenza ai farmaci.

Risultati e prodotti 2010

I pazienti con CLL, le cui cellule utilizzano geni codificanti per la parte variabile delle Ig "non mutati" e esprimono in CD38 e ZAP-70, hanno un decorso clinico più aggressivo dei pazienti con cellule che utilizzano geni "mutati" e non esprimono CD38 e ZAP-70. Il nostro gruppo ha proposto una metodica di scoring del rischi e ha impostato, nell'ambito del Gruppo Italiano per lo Studio dei Linfomi (GISL), un trial clinico preliminare con l'obiettivo di chiarire se il trattamento precoce di pazienti a rischio determina un miglioramento del DFS e dell' OS. Al fine di ampliare le osservazioni sovraesposte durante il 2010 sono stati processati nel nostro laboratorio 134 casi di CLL, di cui 63 nuovi casi di CLL con stadio di malattia Binet A, 13 casi con progressione di malattia (Binet B e C) e 58 casi dopo 36 mesi dallo studio alla diagnosi. Questi campioni, sono stati analizzati per l'espressione dei marcatori di prognosi conosciuti : CD38, ZAP-70 e stato mutazionale dei geni IgV. Sulla base della presenza/assenza di 1, 2, o 3 di questi marcatori di prognosi sfavorevoli abbiamo completato l'analisi dello score di 56/63 dei casi all'esordio di malattia: n 20 casi con score 0, 14 casi con score 1, 15 casi a score 2 e 7 casi a score 3. Dei casi studiati dopo 36 mesi abbiamo osservato in maniera preliminare che 10 casi aumentano lo score e che il fattore prognostico che varia è lo ZAP-70.

IL trial clinico CAM-CLL1, che prevedeva la randomizzazione dei pazienti a cattiva prognosi per il trattamento immediato o a progressione con Alemtuzumab (Campath), si è concluso, e i 41 pazienti arruolati sono stati valutati per la malattia minima residua con metodi citofluorimetrici e molecolari mediante valutazione del riarrangiamento clonale delle Ig.

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

In collaborazione col gruppo del prof. Neri dell'Ospedale Maggiore di Milano, abbiamo condotto studi sulla delezione 13q14 mediante analisi genomica integrativa (Mosca L. et al., Clin. Cancer Res., 2010). Mediante la tecnologia SNP e quella del GEP abbiamo studiato 100 pazienti in stadio Binet A con la delezione 13q14 che risulta l'anomalia genetica più frequente nella CLL. Questo tipo di analisi ha identificato 2 gruppi di pazienti, quelli che hanno una delezione corta e biallelica verso quelli con delezione ampia e monoallelica. L'analisi con SNP concorda con l'esistenza di 2 sottogruppi per espressione differenziale di geni in GEP. Questa differenza può avere una rilevanza clinica, per questo l'analisi sarà estesa a più pazienti all'esordio e in progressione di malattia.

Pubblicazioni

Chiorazzi N.-Ferrarini M.

Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. Blood Epub Dec 9, 2010

De Toter D.-Capaia M.-Fabbi M.-Croce M.-Meazza R.-Cutrona G.-Zupo S.-Loiacono F.-Truini M.-Ferrarini M.-Ferrini S. Heterogeneous expression and function of IL/21R and susceptibility to IL/21 mediated apoptosis in follicular lymphoma cells.

Exp. Hematol. 38:373/383, 2010

Molica S.-Digiesi G.-Battaglia C.-Cutrona G.-Antenucci A.-Molica M.-Giannarelli D.-Sperduti I.-Gentile M.-Morabito F.-Ferrarini M.

Baff serum level predicts time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia.

Eur. J. Haematol. 85:314/320, 2010

PubMed Abstract

Molica S.-Di Raimondo F.-Cutrona G.-Fabris S.-Mauro F.-Brugiatelli M.-Baldini L.-Musto P.-Sacchi S.-Cortelezzi A.-Foa' R.-Neri A.-Federico M.-Ferrarini M.-Morabito F.-Gruppo Italiano Studio Linfomi (GISL)

Clinical categories identified by a new prognostic index reflect biological characteristics of patients in early chronic lymphocytic leukemia: The Gruppo Italiano Studio Linfomi (GISL) experience. Letter.

Leuk. Res. 34:e217/e218, 2010

Morabito F.-Cutrona G.-Gentile M.-Fabbi M.-Matis S.-Colombo M.-Reverberi D.-Megna M.-Spriano M.-Callea V.-Vigna E.-Rossi E.-Lucia E.-Festini G.-Zupo S.-Molica S.-Neri A.-Ferrarini M.

Prognostic relevance of in vitro response to cell stimulation via surface IgD in binet stage a CLL. Letter.

Br. J. Haematol. 149:160/163, 2010

Morabito F.-Cutrona G.-Gentile M.-Loiacono F.-Matis S.-Recchia A.-Gigliotti V.-Callea V.-Zupo S.-Ferrarini M.

More on the determination of Ki/67 as a novel potential prognostic marker in B cell chronic lymphocytic leukemia. Letter.

Leuk. Res. 34:e326/e328, 2010

Mosca L.-Fabris S.-Lionetti M.-Todoerti K.-Agnelli L.-Morabito F.-Cutrona G.-Andronache A.-Matis S.-Ferrari F.-Gentile M.-Spriano M.-Callea V.-Festini G.-Molica S.-Lambertenghi Delilliers G.-Bicciato S.-Ferrarini M.-Neri A.

Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion.

Clin. Cancer Res. 16(23):5641/5653, 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

I pazienti con CLL continueranno ad essere arruolati nel 2011, sia gli esordi di malattia sia le progressione di malattia dei pazienti precedentemente inseriti nel protocollo. Tutti i casi saranno nuovamente testati per i fattori di prognosi vecchi e nuovi per valutarne la stabilità nei diversi stadi di malattia. Inoltre, in collaborazione col Prof Neri dell'Ospedale Maggiore di Milano, le CLL saranno tipizzate tutte per le anomalie citogenetiche più frequenti, quali 13q-, 17p-, 11q-, trisomia 12, e quelle nuove come la 2p-facilmente evidenziabili con FISH. Infine saranno condotti degli studi di GEP, SNIPS, e miRNA sui campioni di cellule neoplastiche.

Nuove alterazioni citogenetiche saranno individuate con l'uso di queste metodiche, e successivamente testate su un'ampia casistica mediante FISH.

Infine studi sono in corso di analisi degli stereotipi su tutta la casistica (più di 1000 casi) di CLL del laboratorio.

Studio di marcatori predittivi di risposta al trattamento chemioterapico in pazienti con carcinoma mammario localmente avanzato: T2-4, N1-2, ER+/-, PgR+/-

Linea di ricerca: 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

Programma: b - Predizione della risposta ai trattamenti, inclusa la possibilità di valutare precocemente la risposta definitiva

Responsabile scientifico: Loredana Miglietta

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Sonia Lastraioli, Martina Serra, Patrizia Piccioli

Anno di inizio: 2009

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Durata: 36 mesi

Parole chiave: ca. mammario; terapia neoadiuvante; taxanidi; antracicline; marcatori biologici

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Oncologia chirurgica (F. Cafiero, P. Meszaros); s.s. Day surgery (L. Moresco), s.c. Anatomia e citoistologia patologica (M. Truini, F. Carli, S. Salvi)

Altri Enti coinvolti: ASL3 Liguria (L. Canobbio, L. Anselmi); ASL5 Liguria (F. Vaira); Ospedale S. Corona, Pietra Ligure, Savona (C. Naso); Clinica Malattie dell'Apparato Cardiovascolare, A.O.U. San Martino, Genova (A. Balestrero, L.Tixi)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica osservazionale

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute; Compagnia di San Paolo

Background

Il trattamento chemioterapico neoadiuvante è un'opzione terapeutica per le pazienti con carcinoma (ca.) mammario localmente avanzato (T2-T4, N1-N2).

La biologia del tumore mammario è estremamente articolata; semplificando, allo stato attuale, sono riconosciute almeno quattro tipologie di carcinoma mammario, definite in base a marcatori prognostici e predittivi : ca. mammario con recettori ormonali ER e PgR positivi, ca. mammario con recettori ormonali ER e PgR negativi, ca. mammario in cui l'espressione dell'oncogene Her2/neu è associato sia a recettori ormonali positivi, sia negativi e ca. mammario definito "Triple negative" (ER, PgR ed Her2/neu negativi).

Il nostro studio si rivolge a quel gruppo di pazienti con carcinoma mammario localmente avanzato, sia esso con recettore ormonali positivi, sia negativi.

E' infatti noto che le pazienti con ca. mammario localmente avanzato e recettori ormonali positivi, sottoposte a trattamento chemioterapico neoadiuvante, ottengono una remissione patologica completa (pCR) in una percentuale bassa (5%-18%). In contrapposizione, le pazienti con ca. mammario e recettori ormonali negativi sono tradizionalmente più sensibili alla chemioterapia e, dopo trattamento neoadiuvante, hanno una percentuale di pCR del 40-50%. Il raggiungimento della pCR è comunque un end point importante per entrambi i gruppi, perchè impatta significativamente sulla DFS (intervallo libero da malattia) e sull'OS (sopravvivenza) delle pazienti.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale: la realizzazione del progetto potrebbe portare all'identificazione di nuovi marcatori biologici in grado di selezionare un sottogruppo di pazienti che rispondono alle due classi di farmaci maggiormente utilizzate nel trattamento chemioterapico neoadiuvante: i Taxanidi e le Antracicline.

I risultati ottenuti, in termini di espressione e modulazione dei vari marcatori analizzati, consentirà di valutare e quindi selezionare:

- le pazienti in cui il ca. mammario risulti chemio-sensibile, suggerendo che questo gruppo di soggetti potrebbe essere sottoposto, come prima scelta terapeutica, alla chemioterapia;
- le pazienti con tumore chemio-resistent, da sottoporre, come prima scelta terapeutica, all'intervento chirurgico, evitando la tossicità collaterale alla chemioterapia e la possibile comparsa di nuovi cloni cellulari tumorali, in corso di trattamento non efficace.

Obiettivo primario:

- correlare i livelli di espressione di ciascun marcatore, sia singolarmente, sia in associazione, con la Risposta patologica Completa (pCR, e anche con una risposta parziale).

Obiettivi secondari:

correlare i livelli di espressione di ciascun marcatore, sia singolarmente, sia in associazione con i seguenti parametri clinici e patologici :

- risposta clinica sul tumore primario (downsizing) valutata dopo 3 e 6 cicli di trattamento
- breast conservative surgery (mastectomia vs quadrantectomia/tumorectomia)
- residual tumor burden (indice che comprende la valutazione patologica del tumore primario, dimensioni e cellularità) e le metastasi linfonodali (numero e dimensioni)
- DFS (intervallo libero da malattia)
- OS (sopravvivenza).

Impatto assistenziale certo o potenziale

L'identificazione di potenziali marcatori, che permettano di discriminare tra tumori chemio-sensibili o chemio-resistenti, fornirebbe al clinico un ulteriore strumento per la scelta della strategia terapeutica più opportuna (chemioterapia neoadiuvante vs. intervento chirurgico immediato). Questo sarebbe particolarmente rilevante nel caso dei tumori mammari localmente avanzati, con recettori ormonali positivi, che sono noti rispondere meno alla chemioterapia neoadiuvante.

La razionalizzazione del trattamento terapeutico ottimale potrebbe, inoltre, ottimizzare i costi e l'utilizzo delle risorse.

L'identificazione di nuovi marcatori biologici potrebbe, per di più, avere un'applicabilità generale, poiché questi marcatori potrebbero essere valutati su una casistica allargata di pazienti, trasferendo le nuove metodiche ad altri laboratori, servizi di anatomia patologica, oncologie mediche/chirurgiche della regione. Inoltre, questi marcatori, una volta validati opportunamente, potrebbero essere impiegati anche per l'ottimizzazione delle terapie adiuvanti.

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Pazienti, Sistema Sanitario Nazionale e la Comunità Scientifica potrebbero esserne i potenziali beneficiari.

Risultati e prodotti 2010

Nel corso del 2010 è stato ampliato il pannello di geni, e relativi prodotti proteici, inizialmente individuati quali potenziali marcatori di risposta a regimi terapeutici neoadiuvanti con taxani ed antracicline. Riscontri scientifici recenti hanno infatti suggerito l'opportunità di analizzare l'espressione del fattore di trascrizione FoxM1 che ha un ruolo importante nella progressione tumorale poiché regola vari pathways cellulari e geni rilevanti per mantenere un corretto equilibrio tra proliferazione cellulare, differenziamento ed apoptosi, tra gli altri alcuni dei geni la cui analisi era stata inizialmente prevista (per es. p27^{kip}, Skp2, birc5).

Sono stati inoltre esaminate e messe a punto le condizioni sperimentali ottimali per l'analisi delle principali varianti di splicing di birc5 (survivina). A livello genico, oltre al trascritto primario, sono state identificate numerose varianti generate per splicing alternativo. Quattro di queste sono espresse nel carcinoma della mammella e sono potenzialmente interessanti, da un punto di vista clinico e biologico, essendo caratterizzate da funzioni solo in parte sovrapponibili a quelle del trascritto primario: per es. la variante Δ ex3 sembra mantenere solo l'attività anti-apoptotica, ma non quella regolatoria del ciclo cellulare, mentre la Survivina-2B, caratterizzata da un dominio BIR troncato, potrebbe avere funzione pro-apoptotica. L'analisi dell'espressione di queste varianti, ed il rapporto di espressione con il trascritto primario, suggerisce un loro potenziale significato prognostico e predittivo di risposta ai trattamenti chemioterapici con taxani ed antracicline.

Ad oggi sono pervenuti 3 campioni Tru-Cut prelevati, immediatamente prima dell'inizio del trattamento chemioterapico, da pazienti con carcinoma della mammella localmente avanzato, con caratteristiche compatibili con i criteri di inclusione previsti nello studio. Da questi campioni è stato estratto RNA messaggero, che essendo risultato qualitativamente idoneo (sulla base del RIN) è stato utilizzato per l'analisi dell'espressione, in Real Time PCR semiquantitativa, dei 15 trascritti di interesse, le cui condizioni sperimentali erano state precedentemente standardizzate.

Attività previste e risultati attesi nel 2011

E' previsto che siano arruolate circa 20 pazienti, nei vari centri che partecipano a questo studio. Per la maggior parte delle pazienti si prevede, inoltre, che sarà disponibile materiale tumorale prelevato al momento dell'intervento chirurgico, post-chemioterapia.

I livelli di espressione dei geni di interesse saranno valutati su almeno il 90% del materiale raccolto e risultato idoneo all'analisi istologica, secondo i criteri precedentemente stabiliti. I livelli di espressione di ciascun marcatore (singolarmente, rispetto a varianti geniche ed a quelli di altri geni funzionalmente correlati) saranno, in prima istanza, valutati indipendentemente e successivamente correlati con la Risposta patologica completa (pCR), parziale e con parametri clinici e patologici (Endpoints); eventuali associazioni e differenze saranno esaminate con opportuni test statistici. Valori di $P < 0.05$ saranno considerati statisticamente significativi.