

PROGETTO DI RICERCA / RESEARCH PROJECT
(max 5 pagine / max 5 pages)

| | |
|---|---|
| Borse DM 351/2022 Scholarships DM 351/2022 Vedi scheda del corso e art. 2 del bando. <i>Refer to PhD Sheet and art. 2 of the Call.</i> | Selezionare una sola opzione. <i>Select only one option:</i> <input type="checkbox"/> PA <input type="checkbox"/> PC <input type="checkbox"/> PNRR <input type="checkbox"/> TDA |
| Borse DM 352/2022 Scholarships DM 352/2022 Vedi scheda del corso e art. 3 del bando. <i>Refer to PhD Sheet and art. 3 of the Call.</i> | Indicare il codice della borsa DM 352/2022 per la quale si intende partecipare. <i>Insert the code of the DM 352/2022 scholarship to apply.</i> [PNNR. _____] |
| Borse di Ateneo su tema vincolato Scholarships on specific research topic Vedi scheda del corso. <i>Refer to PhD sheet.</i> | Indicare il codice della borsa di ateneo con tema vincolato per la quale si intende partecipare. <i>Insert the code of the University scholarship on specific research topic:</i> [BA. _____] |

| | |
|---|--|
| Cognome / Surname | Di Giovanni |
| Nome / Name | Emilia |
| Titolo del progetto / Project title | Ruolo prognostico e predittivo del PD-L1 esosomiale in pazienti con tumore al seno triplo negativo in trattamento antineoplastico. |
| Corso di dottorato / PhD | Oncologia e chirurgia sperimentali |
| Firma del candidato/ Applicant's signature | |

1 - Sommario / Abstract

Il carcinoma mammario triplo-negativo (TNBC), caratterizzato dall'assenza dell'espressione del recettore per gli estrogeni (ER), del recettore per il progesterone (PR) e dall'assenza di amplificazione o di overespressione del recettore per il fattore di crescita epiteliale umano HER2, rappresenta oggi circa il 10-20% di tutti i tumori al seno ed è contraddistinto da alta eterogeneità, prognosi sfavorevole, marcata aggressività ed elevato tasso mutazionale.

Negli ultimi anni, il trattamento del tumore al seno ha compiuto notevoli progressi, portando allo sviluppo di trattamenti individualizzati e mirati, con l'obiettivo di migliorare l'*outcome* clinico e la sopravvivenza. In questo contesto, i recenti sviluppi nell'immunoterapia hanno fatto sperare che questa forma di trattamento possa essere efficace nel tumore al seno, e in particolare in TNBC, dove il PD-L1 è espresso in circa il 20% dei tumori.

In particolare, si è scoperto che PD-L1 è fortemente espresso sugli esosomi derivati dal cancro al seno e che il livello di esosomi PD-L1 positivi è un biomarcatore prognostico e predittivo di risposta all'immunoterapia anti-PD-1, che può essere fondamentale per la gestione del tumore.

2 - Descrizione del progetto / Project

Introduzione

Il cancro al seno è, ad oggi, considerato la seconda causa di morte per cancro e il tumore maligno più comune nelle donne.

Tra i sottotipi molecolari di tumore alla mammella, il carcinoma mammario triplo-negativo (TNBC) rappresenta circa il 10-20% di tutti i tumori al seno ed è caratterizzato da alta eterogeneità, prognosi sfavorevole, marcata aggressività ed elevato tasso mutazionale. Dal punto di vista molecolare, il TNBC è caratterizzato dall'assenza dell'espressione del recettore per gli estrogeni (ER), del recettore per il progesterone (PR) e dall'assenza di amplificazione o di overespressione del recettore per il fattore di crescita epiteliale umano HER2. È comune tra le donne di età inferiore ai 40 anni, è definito un tumore ad alto grado, spesso identificato a stadi avanzati, è associato a un elevato rischio di recidiva ed è caratterizzato da un basso *survival rate* a 5 anni. Si presenta, nella maggior parte dei casi, con un'istologia di carcinoma duttale infiltrante (CDI) ed è associato a un *outcome* peggiore rispetto agli altri tipi di tumore della ghiandola mammaria.

Alterazioni nei geni *BRCA1/2* si presentano nel 10-20% dei TNBC ed è stato riscontrato che oltre l'80% dei tumori TNBC risulta *BRCA1* mutato, mentre solo il 20% *BRCA2* mutato. Alterazioni somatiche nei geni *BRCA1/2* si verificano nel 3-5% dei casi di TNBC.

I risultati clinici ottenuti oggi nella cura di questo tumore risultano spesso insoddisfacenti, anche a causa della chemioresistenza, portando dunque verso lo sviluppo di nuovi trattamenti efficaci e mirati.

È stato da poco dimostrato che il trattamento con gli inibitori dei checkpoint immunitari (ICIs) migliora l'esito clinico di pazienti con TNBC.

Infatti, sebbene tradizionalmente il cancro al seno non era considerato un tumore particolarmente immunogeno, recenti sviluppi hanno dimostrato che alcuni TNBC aggressivi, altamente immunogenici, resistenti alla chemioterapia e con prognosi sfavorevole, esprimono molecole identificate come bersagli per l'immunoterapia. Il *focus* della ricerca e del trattamento è stato principalmente diretto contro una molecola del checkpoint immunitario, il ligando di morte programmata 1 (PD-L1). PD-L1 è espresso nelle cellule B e T e nelle cellule tumorali così come nei macrofagi e nelle cellule dendritiche.

L'interazione tra PD-L1 e il suo recettore, PD-1, espresso sulla superficie delle cellule T citotossiche, rappresenta un meccanismo di fuga immunitaria e un bersaglio terapeutico per tumori maligni a prognosi sfavorevole, come il melanoma e il cancro del polmone non a piccole cellule.

L'uso dell'immunoterapia rappresenta dunque un trattamento innovativo per le pazienti con TNBC, PD-L1 positivo, presente in circa il 20% dei tumori.

Tuttavia, studi clinici hanno dimostrato che solo alcuni pazienti possono ottenere risposte complete e remissione della malattia. Prove recenti suggeriscono che gli esosomi derivati dal tumore possono essere responsabili dell'immunosoppressione del microambiente tumorale e della resistenza alla terapia del checkpoint immunitario anti-PD-L1/PD-1.

Gli esosomi, appartenenti alla famiglia dei veicoli elettrici, sono delle nano-vescicole extracellulari, di dimensioni comprese tra i 30 e i 100 nm, che contengono proteine, lipidi, mRNA, DNA, siRNA; il carico intravesicolare può variare in base al tipo cellulare che li ha secreti o alla loro funzione su una cellula ricevente. Essi derivano da membrane di corpi multivescicolari, sono stati rilevati in diversi fluidi biologici, tra cui il plasma, svolgono diversi ruoli sia in condizioni fisiologiche che patologiche nella comunicazione cellulare, sono implicati in processi di trasformazione cellulare e immuno-regolazione, ed hanno un ruolo anche nella progressione tumorale e nella formazione di metastasi. Inoltre, gli esosomi di derivazione tumorale possono veicolare antigeni specifici utili nei processi diagnostici. Il rilascio di esosomi da parte delle cellule tumorali facilita la comunicazione tra le cellule neoplastiche stesse, con cellule endoteliali o con cellule infiammatorie. A livello tumorale, gli esosomi, modulano la risposta immunitaria presentando neo-antigeni che attivano cellule T, cellule natural killers o macrofagi. Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato come esosomi derivanti da cellule tumorali che presentavano sulla loro superficie PD-L1, possono inibire le funzioni delle cellule T, la produzione di citochine e la citotossicità, dimostrando dunque che la funzione di regolazione delle cellule immunitarie può essere bloccata dagli esosomi tumorali.

In particolar modo, è stato visto che il plasma di pazienti con cancro al seno contiene concentrazioni più elevate di esosomi rispetto al plasma di controlli sani e che l'aumento di PD-L1 esosomico circolante in pazienti con TNBC possa essere utilizzato per predire la risposta del paziente all'immunoterapia.

Obiettivi:

- Valutare l'espressione di PD-L1 su esosomi isolati dal plasma di pazienti con TNBC;
- Studiare la possibile correlazione tra i livelli di espressione di PD-L1, la progressione della malattia e l'*outcome* clinico al fine di valutare il potenziale ruolo di PD-L1 come biomarcatore prognostico e/o predittivo.

Criteri di inclusione:

Lo studio includerà pazienti con età >18 anni e diagnosi istologicamente confermata di tumore al seno triplo negativo (ER-, PR-, HER2-) che hanno firmato un consenso informato scritto. Per ciascun paziente verranno raccolte le informazioni riguardanti la storia personale e familiare di tumore, l'età alla diagnosi, il sottotipo istologico, il fenotipo molecolare, lo stadio della malattia, lo stato mutazionale e l'*outcome* clinico (*progression free survival* e *overall survival*).

MATERIALI E METODI

- Tutti i pazienti con TNBC verranno prospetticamente arruolati nello studio, dopo aver firmato un consenso informato scritto;
- Per ciascun paziente verranno raccolte 4 provette di sangue periferico venoso in EDTA;

- I campioni di sangue periferico verranno processati entro 2 h dalla raccolta, mediante due centrifugazioni (3000 rpm, 10 minuti, 4°C; 16000 rcf, 10 minuti, 4°C), al fine di isolare il plasma dalla parte corpuscolata del sangue;
- Il plasma ottenuto verrà aliquotato in criotubi e conservato a -80°C;
- Aliquote da 1 ml di plasma verranno scongelate per l'isolamento degli esosomi;
- Gli esosomi verranno isolati da circa 2-3 ml di plasma attraverso l'utilizzo di kit commerciali e caratterizzati tramite DLS (Dynamic Light Scattering);
- L'RNA verrà estratto dagli esosomi attraverso l'utilizzo di kit commerciali e quantizzato attraverso sistema spettrometrico Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) o fluorimetrico Qubit (Life Technologies);
- L'analisi dell'espressione genica di PD-L1 verrà effettuata mediante digital droplet PCR (ddPCR) utilizzando specifiche sonde TaqMan;
- Il livello di espressione di PD-L1 verrà normalizzato rispetto ai geni *housekeeping* utilizzati come controllo interno per la quantificazione;
- I dati derivanti dall'analisi verranno successivamente correlati con le caratteristiche clinicopatologiche dei pazienti.

Risultati attesi:

L'avvento dell'immunoterapia ha segnato una nuova era nel trattamento del tumore, determinando risposte clinicamente significative e più durature. Nonostante il suo iniziale successo in diverse neoplasie, i tassi di risposta rimangono ancora bassi.

Un fattore chiave alla base della scarsa risposta è la complessità delle interazioni tra le cellule tumorali e il microambiente e l'esistenza di molteplici meccanismi di soppressione immunitaria mediata dal tumore stesso. La comprensione delle interazioni dinamiche tra le cellule tumorali e il sistema immunitario permetterebbe lo sviluppo di terapie personalizzate e approcci ottimali per migliorare l'*outcome* clinico in pazienti con tumore in stadio avanzato.

Lo sviluppo di biomarcatori prognostici e/o predittivi potrebbe aiutare a superare alcune di queste limitazioni. In questo scenario, dunque, la comprensione dei meccanismi fisiopatologici mediati dalle vescicole esosomiali, che stanno alla base dell'interazione tra cellule tumorali e microambiente, e i livelli di espressione di PD-L1 potrebbero rappresentare un importante fattore predittivo di risposta all'immunoterapia in pazienti con TNBC.

3 - Bibliografia / References

- 1) Remy Thomas, Ghaneya Al-Khadairi, and Julie Decock :Immune Checkpoint Inhibitors in Triple Negative Breast Cancer Treatment: Promising Future Prospects, 2020
- 2) Maria Gato-Cañas, Miren Zuazo, Hugo Arasanz, Karine Breckpot, Grazyna, Kochan David Escors. PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity, 2022
- 3) Qingyang Lei , Dan Wang , Kai Sun , Liping Wang , e Yi Zhang. Resistance Mechanisms of Anti-PD1/PDL1 Therapy in Solid Tumors. 2020
- 4) Elena Vagia,* Devalingam Mahalingam, and Massimo Cristofanilli. The Landscape of Targeted Therapies in TNBC. 2020
- 5) Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. Breast Cancer Res. 2020 Jun 9;22(1):61. doi: 10.1186/s13058-020-01296-5. PMID: 32517735; PMCID: PMC7285581.
- 6) Burgio S, Noori L, Marino Gammazza A, Campanella C, Logozzi M, Fais S, Bucchieri F, Cappello F, Caruso Bavisotto C. Extracellular Vesicles-Based Drug Delivery Systems: A New Challenge and the Exemplum of Malignant Pleural Mesothelioma. Int J Mol Sci. 2020 Jul 30;21(15):5432. doi: 10.3390/ijms21155432. PMID: 32751556; PMCID: PMC7432055.
- 7) Zhang L, Yu D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2019 Apr;1871(2):455-468. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.04.004. Epub 2019 Apr 30. PMID: 31047959; PMCID: PMC6542596.
- 8) Dong X, Bai X, Ni J, Zhang H, Duan W, Graham P, Li Y. Exosomes and breast cancer drug resistance. Cell Death Dis. 2020 Nov 17;11(11):987. doi: 10.1038/s41419-020-03189-z. PMID: 33203834; PMCID: PMC7673022.
- 9) Sukumar J, Gast K, Quiroga D, Lustberg M, Williams N. Triple-negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development. Expert Rev Anticancer Ther. 2021 Feb;21(2):135-148. doi: 10.1080/14737140.2021.1840984. PMID: 33198517; PMCID: PMC8174647.
- 10) Ye L, Zhu Z, Chen X, Zhang H, Huang J, Gu S, Zhao X. The Importance of Exosomal PD-L1 in Cancer Progression and Its Potential as a Therapeutic Target. Cells. 2021 Nov 19;10(11):3247. doi: 10.3390/cells10113247. PMID: 34831468; PMCID: PMC8619537.
- 11) Ya Cao, Ying Wang, Xiaomeng Yu, Xihui Jiang, Gang Li, Jing Zhao, Identification of programmed death ligand1 positive exosomes in breast cancer based on DNA amplification-responsive metal-organic frameworks, Biosensors and Bioelectronics, Volume 166,2020, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112452>.

Gantt chart

| | YEAR 1 | | | | | | | | | | | | YEAR 2 | | | | | | | | | | | | YEAR 3 | | | | | | | | | | | |
|---|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 |
| A | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

- A. Ricerca bibliografica
- B. Arruolamento pazienti
- C. Analisi
- D. Scrittura tesi