

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA**

**Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche**



**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN  
MEDICINA E CHIRURGIA**

**Anno Accademico 2019-2020**

**TESI DI LAUREA**

*“Neuroblastoma ad alto rischio: integrazione delle  
informazioni cliniche e biologiche per lo sviluppo di  
modelli prognostici.”*

**Relatore: Prof. Angelo Ravelli**

**Correlatore: Dott.ssa Alessandra Eva**

**Candidata: Gloria Lalli**

# INDICE

<b>1. Introduzione</b> .....	2
1.1. Il Neuroblastoma.....	2
1.1.1. Presentazione clinica.....	3
1.1.2. Diagnosi .....	5
1.1.3. Stadiazione e classificazione del rischio .....	8
1.1.4. Terapia .....	12
1.2. Patogenesi e genetica del Neuroblastoma .....	19
1.2.1. Patogenesi molecolare.....	19
1.2.2. Neuroblastoma familiare.....	21
1.2.3. Neuroblastoma sporadico.....	23
1.2.4. Alterazioni genetiche .....	25
<b>2. Scopo del lavoro</b> .....	32
<b>3. Materiali e metodi</b> .....	35
3.1. Campione .....	35
3.2. Purificazione dei microRNA esosomiali.....	36
3.2.1. Analisi dell'espressione dei miRNA .....	36
3.3. Array-CGH: ibridazione genomica comparativa (CGH) .....	38
3.3.1. Analisi dei dati .....	39
3.4. Dati clinici.....	40
3.5. Piattaforma XTENS2 .....	41
3.6. Analisi bioinformatica.....	43
<b>4. Risultati</b> .....	44
4.1. Caratteristiche della popolazione .....	44
4.2. Analisi dell'outcome .....	47
4.3. Analisi dell'evento recidiva .....	49
<b>5. Discussione</b> .....	51
5.1. Biomarcatori di sopravvivenza .....	52
5.2. Biomarcatori di ricaduta.....	54
<b>6. Conclusioni</b> .....	57
<b>7. Bibliografia</b> .....	58

# 1. Introduzione

## 1.1. Il Neuroblastoma

Il neuroblastoma è la più frequente neoplasia maligna solida extracranica del bambino, con un'incidenza annuale di circa 10 casi per milione di bambini sotto i 15 anni di età.

(1)

Deriva da cellule della cresta neuronale primordiale che, in condizioni normali, migrano dal tubo neurale dorsale e si differenziano quando raggiungono le strutture del sistema nervoso simpatico. In alcuni casi, difetti ancora poco definiti nella migrazione, maturazione o differenziazione possono portare ad uno sviluppo in senso neoplastico.

Il 90% dei tumori insorge in bambini di età inferiore ai 10 anni, ma il maggior numero di casi è rilevato nel periodo perinatale e, comunque, prima dei 5 anni di età; l'età mediana alla diagnosi è infatti di 18 mesi. (2)

Il neuroblastoma si sviluppa raramente negli adolescenti e nei giovani adulti, i quali rappresentano meno del 5% dei casi (3) ed è più comune nei maschi rispetto alle femmine, anche se non si conoscono le basi genetiche ed epigenetiche di questa preponderanza.

Il fenotipo della malattia è spesso associato all'etnia e all'età: nei bambini di origine africana il tumore ha un'incidenza inferiore, ma un fenotipo con maggiore malignità e tassi di sopravvivenza minori, mentre, per quello che riguarda l'età, i bambini sotto i 12 mesi hanno più probabilità di andare incontro a regressione spontanea rispetto a bambini con età maggiore. (4)

Studi di screening su larga scala di neonati hanno portato alla diagnosi di neuroblastoma in un numero più elevato di bambini, sebbene la maggior parte dei tumori rilevati fosse a basso rischio, con caratteristiche cliniche e biologiche favorevoli. Ciò ha dimostrato quindi che circa la metà dei casi di neuroblastoma insorti nel primo anno di vita non vengono identificati a causa di una successiva e completa regressione spontanea. (3)

Al momento però non sono raccomandati programmi di screening affidabili e specifici per il neuroblastoma, se non per soggetti con una particolare predisposizione familiare o portatori di sindromi associate ad un aumentato rischio di sviluppo di neoplasie.

Per quanto riguarda la predisposizione genetica, si è visto che una storia familiare di tumore neuroblastico periferico si riscontra nell'1% circa dei pazienti. (5)

L'eziologia della maggior parte dei tumori pediatrici rimane sconosciuta, tuttavia vi sono alcune sostanze chimiche che sono state indiziate come predisponenti alla loro insorgenza, ma senza alcuna conferma definitiva. La precoce età alla diagnosi suggerisce infatti che l'esposizione prenatale a droghe, fumo, alcool, pesticidi, idrocarburi e farmaci da parte della madre potrebbero avere un ruolo nella malattia, ma con un effetto molto meno determinante rispetto alle neoplasie dell'adulto. (5)

Viceversa, è stato associato un effetto protettivo all'assunzione in gravidanza di acido folico, per il suo ruolo nello sviluppo neuronale.

Alle forme ereditarie sono associate varie mutazioni germinali, in particolare a carico dei geni ALK e PHOX2B, coinvolti nello sviluppo della cresta neurale, così come alcune patologie genetiche correlate allo sviluppo della cresta neurale (s. di Turner, malattia di Hirschsprung, Sindrome di Beckwith-Wiedemann e Neurofibromatosi di tipo 1). (5)

### 1.1.1. Presentazione clinica

I segni e i sintomi clinici del neuroblastoma sono strettamente correlati alla localizzazione del tumore primario e ai siti della malattia metastatica.

È un tumore neuroendocrino che deriva dalle cellule della cresta neurale, dalla quale fisiologicamente prendono origine le strutture del sistema simpatico, pertanto tale tumore può formarsi in qualsiasi parte di quest'ultimo.

In due terzi dei casi il neuroblastoma origina a livello addominale nella midollare surrenalica (associato ad una sopravvivenza inferiore rispetto alle altre localizzazioni; i tumori surrenali primari bilaterali si verificano in <1% di tutti i casi) o nei gangli simpatici addominali paravertebrali o celiaci, portando alla formazione di una massa addominale

palpabile con associati o meno sintomi da compressione degli organi circostanti come ipertensione, distensione addominale e dolore. (3)

In caso di insorgenza a livello dei gangli paraspinali/paravertebrali è possibile una compressione del midollo spinale a causa dell'espansione della massa attraverso i forami intervertebrali, situazione che deve essere affrontata come una vera emergenza oncologica.

Nel 20% dei casi il tumore origina a livello dei gangli mediastinici con possibili sintomi respiratori, mentre nel 5% dei casi origina nel collo, dove si presenta come una massa laterocervicale talvolta accompagnata dalla sindrome di Bernard-Horner caratterizzata da ptosi, miosi, enoftalmo e possibile anidrosi, o nella pelvi, con possibili problemi sfinteriali. (5)

Solo nel 1-2% dei casi non viene identificato un tumore primitivo e la malattia si presenta con sole lesioni metastatiche. (5)

La malattia metastatica, registrata in circa il 40-50% dei pazienti alla diagnosi, si rileva specialmente a livello osseo e midollare ed è spesso associata a dolore, calo ponderale, febbre, anemia, trombocitemia ed ecchimosi periorbitarie.

Il riscontro di metastasi a linfonodi, fegato e cute, seppur raro, è più comune nei bambini di età inferiore ai 18 mesi. Estremamente raro all'esordio è il coinvolgimento di polmoni e sistema nervoso centrale. (5)

Raramente, l'insorgenza del neuroblastoma è associata a sindromi paraneoplastiche, come l'iperproduzione di metaboliti catecolaminici accompagnata da ipertensione arteriosa e cefalea o come l'ipersecrezione di peptide intestinale vasoattivo da parte delle cellule tumorali con conseguente diarrea acquosa profusa che colpisce meno dell'1% dei casi.

Un 2% dei casi esordisce con la Sindrome Opsoclono Mioclono, un raro disordine neurologico paraneoplastico caratterizzato da sintomi neurologici quali opsoclono (movimenti oculari coniugati rapidi, involontari, multidirezionali), mioclono (contrazioni brevi e involontarie di un muscolo o di un gruppo di muscoli), grave irritabilità e atassia cerebellare, che è probabilmente causata da un processo autoimmune a carico del cervelletto. Questi pazienti hanno una buona prognosi, ma sviluppano spesso sequele psicomotorie e/o deficit cognitivi importanti. (3)

### 1.1.2. Diagnosi

La conferma di una diagnosi di neuroblastoma richiede, oltre ad un accurato esame clinico, una serie di valutazioni tra cui: esami di laboratorio, imaging radiografico e valutazione istologica del tumore.

- A livello **ematochimico**, oltre agli esami routinari (emocromo, funzionalità epatica e renale, profilo coagulativo, LDH e ferritina) è fondamentale il dosaggio dei metaboliti urinari delle catecolamine (acido omovanillico, HVA e vanilmandelico, VMA). Questo test, che è altamente sensibile e specifico per il neuroblastoma, viene eseguito sulla minzione del mattino. I metaboliti urinari risultano notevolmente aumentati in circa il 90 % di tutti i pazienti con neuroblastoma e le loro quantità relative sono correlate al grado di differenziazione delle cellule derivate dalla cresta neurale tumorale, con livelli aumentati associati a un decorso sfavorevole della malattia. (3) In rari casi, un aumento dei livelli di noradrenalina o adrenalina secreti dal tumore può portare a ipertensione arteriosa.

Nel caso in cui dovesse essere difficile ottenere campioni di urina adeguati, come nel caso dei neonati, il dosaggio dei metaboliti a livello ematico rappresenta un'alternativa valida. Livelli aumentati di marcatori sierici invece, come lattato deidrogenasi o enolasi neurone-specifica, sono stati descritti come marcatori prognostici sfavorevoli ma con bassa specificità.

- Per quanto riguarda **l'imaging**, il primo approccio è l'esecuzione di un'ecografia addominale e di una RX del torace, e, successivamente, a causa della bassa invasività e dell'alta disponibilità, si prosegue con una risonanza magnetica (RM) o una tomografia computerizzata (TC) con mezzo di contrasto per precisare l'estensione della malattia.

La RM, nonostante i tempi di acquisizione più lunghi e la necessità di sedazione nei bambini molto piccoli, è solitamente preferita per l'assenza di radiazioni ionizzanti e per la maggiore risoluzione di contrasto soprattutto nei casi di estensione tumorale nel canale intraspinale.

La stadiazione completa richiede aspirati bilaterali e biopsie di midollo osseo, esame istologico e immunoistochimica, soprattutto in caso di sospetto di metastasi.

L'entità della malattia metastatica viene infatti valutata mediante:

- 2 aspirati midollari + 2 biopsie osteomidollari da entrambe le creste iliache anteriori per valutare l'eventuale infiltrazione tumorale del midollo osseo;
- scintigrafia con metaiodobenzilguanidina radiomarcata con iodio 123 (123I-mIBG), specificatamente captata dalle cellule che originano dal sistema nervoso simpatico, indispensabile per la definizione della stadiazione e per la valutazione della risposta. La maggior parte dei neuroblastomi è avido di mIBG, per cui l'esame ha una sensibilità stimata del 90% e una specificità del 99% e consente la valutazione di patologie sia a livello locale che metastatico. (3)

L'entità della malattia metastatica nei pazienti con neuroblastoma non avido di mIBG (circa il 15% dei casi di neuroblastoma) può essere valutata utilizzando altre tecniche come la scintigrafia ossea con Tecnezio-99, la LTomografia ad Emissione di Positroni con 18f-dopa (DOPA-PET) o la PET con fluoro-desossiglucosio (FBG-PET).

- **Biopsia ed esame istologico:** Nel caso del sospetto di una patologia localizzata inoperabile si procederà alla biopsia della massa primitiva e nello stesso tempo alla valutazione midollare estesa, mentre nel caso di patologia localizzata operabile si procederà all'intervento chirurgico di asportazione della massa e durante l'intervento alla valutazione midollare estesa.

L'istologia del tumore in aggiunta alle caratteristiche genetico-molecolari è essenziale per la stratificazione del rischio prognostico.

La classificazione istologica universalmente riconosciuta è l'*International NB Pathology Classification (INPC)*, che permette di identificare quattro categorie di tumori neuroblastici periferici (TNP), come rappresentato nella *Tabella 1* (6), e, per alcune, anche dei sottotipi, a seconda delle caratteristiche morfologiche sia delle cellule tumorali, sia di quelle associate e stromali.

Tale classificazione definisce l'impatto prognostico di ciascuna categoria, ovvero se è a prognosi favorevole o non favorevole sulla base dell'istotipo, grado di differenziazione, indice mitotico (MKI) e età alla diagnosi.

Per quanto riguarda il Neuroblastoma possiamo identificare tre sottotipi:

- a) *indifferenziato*
- b) *poco differenziato*
- c) *differenziato*

<b>Tabella 1. Classificazione biologica INPC</b>	
<b>Categoria e sottotipo</b>	<b>Gruppo prognostico</b>
<b>Neuroblastoma</b> ( <i>Schwann cell stroma-poor</i> ): -differenziato -poco differenziato -indifferenziato	Sottogruppo con istologia favorevole e non favorevole basata su età, grado di differenziazione neuroblastica e classe di indice mitotico
<b>Ganglioneuroblastoma intermixed</b> ( <i>Schwann cell stroma-rich</i> )	Istologia favorevole
<b>Ganglioneuroma</b> ( <i>Schwann cell stroma-dominant</i> )	Istologia favorevole
<b>Ganglioneuroblastoma nodulare</b> ( <i>Schwann cell stroma-rich/-dominant and stroma-poor</i> )	Istologia non favorevole

- **Biologia:** la definizione delle caratteristiche biologiche del tumore è fondamentale ai fini del trattamento.

Si vanno in particolar modo ad analizzare: mutazioni e amplificazioni a carico dell'oncogene MYCN e del gene ALK, poliploidie ed eventuali alterazioni cromosomiche numeriche o strutturali presenti nel tumore alla diagnosi.

Per l'analisi delle mutazioni e delle alterazioni a livello del genoma si utilizzano la tecnica *array-based Comparative Genomic Hybridization* (array-CGH) e la tecnica *fluorescence In Situ Hybridation* (FISH).

La prima si basa sulla comparazione quantitativa tra il DNA del paziente in esame che prende il nome di "*DNA test*" con un "*DNA reference*" di un individuo sano di controllo e consente di analizzare con una risoluzione molto elevata l'intero



genoma evidenziando anomalie cromosomiche e permettendo l'identificazione di variazioni del numero di copie di piccole dimensioni (microdelezioni e microduplicazioni). Inoltre, consente di definire la regione esatta alterata e i geni in essa contenuti, migliorando la comprensione del rapporto esistente tra le anomalie del DNA e la patologia del paziente esaminato.

La tecnica FISH permette invece di identificare riarrangiamenti e alterazioni in specifiche regioni del genoma. Ha però un limite in quanto è una ricerca mirata, basata su una specifica indicazione clinica, per cui possono essere ritrovate solo alterazioni genetiche associate a determinate patologie note.

### 1.1.3. Stadiazione e classificazione del rischio

**Tabella 2. Stadiazione internazionale secondo l'International Neuroblastoma Staging System**

<b>Stadio</b>	<b>Caratteristiche</b>
<b>Stadio 1</b>	Tumore localizzato confinato all'area di origine, completamente rimosso con l'intervento chirurgico. Linfonodi ipsilaterali e controlaterali negativi microscopicamente.
<b>Stadio 2A</b>	Tumore localizzato con incompleta escissione chirurgica. Linfonodi ipsilaterali e controlaterali negativi microscopicamente.
<b>Stadio 2B</b>	Tumore unilaterale con escissione completa o incompleta. Linfonodi regionali ipsilaterali positivi e controlaterali negativi microscopicamente
<b>Stadio 3</b>	Tumore non resecabile infiltrante con o senza interessamento linfonodale, tumore unilaterale con linfonodi controlaterali positivi o tumore con interessamento dei linfonodi regionali bilateralmente
<b>Stadio 4</b>	Disseminazione del tumore a linfonodi distanti, cute, osso, midollo, fegato e altri organi
<b>Stadio 4S</b>	Tumore primario localizzato con metastasi limitate a cute, fegato e midollo in bambini con età < 1 anno.

Il sistema attualmente utilizzato per valutare l'estensione della malattia è il *Sistema Internazionale di Stadiazione del Neuroblastoma (INSS)*, che si basa sull'entità della resezione chirurgica alla diagnosi e sulla presenza di metastasi come è spiegato nella *Tabella 2.* (7)

È importante notare che, oltre ai classici stadi con cui vengono classificate a livello internazionale le neoplasie maligne, il neuroblastoma presenta lo stadio 4S, che include pazienti di età inferiore a 1 anno con metastasi limitate alla cute, al fegato o al midollo osseo. La caratteristica peculiare di questi pazienti è la possibilità di regressione spontanea della neoplasia. I meccanismi alla base della regressione spontanea non sono ancora completamente chiari, dal momento che molti di questi tumori regrediscono ancor prima di dare sintomatologia e, quindi, di giungere all'attenzione del medico.

Infatti, studi di screening su larga scala di neonati hanno portato alla diagnosi di neuroblastoma in un numero più elevato di bambini grazie al rilevamento di alti livelli urinari di catecolamine, sebbene la maggior parte dei tumori rilevati fosse a basso rischio, con caratteristiche cliniche e biologiche favorevoli.

Lo screening urinario ha dimostrato quindi che circa la metà dei casi di neuroblastoma insorti nel primo anno di vita non vengono identificati a causa di una successiva e completa regressione spontanea. (3)

Alla base di questa regressione sembrano essere coinvolti molteplici fattori quali: l'accorciamento dei telomeri, alti livelli di espressione del recettore della chinasi della tropomiosina A (TrkA) in grado di legare anche il *Nerve Growth Factor* (NGF), eventuali modificazioni epigenetiche e, infine, il sistema immunitario, con generazione di anticorpi contro il tumore. (8)

Parallelamente, siccome l'INSS è un sistema di stadiazione post-chirurgica, l'*International Neuroblastoma Risk Group (INGR)* nel 2009 ha introdotto il sistema di stadiazione *INGR Staging System (INGRSS)* al fine di identificare gruppi secondo una stratificazione del rischio di pretrattamento, come rappresentato nella *Tabella 3.* (9)

L'entità della malattia è determinata dalla presenza o meno di *image-defined risk factors* (IDRF) al momento della diagnosi, ovvero prima di attuare qualsiasi trattamento, definendo gli stadi della malattia come locali (L1 e L2) o metastatici (M e Ms).

<b>Tabella 3. Stadiazione internazionale secondo l'International Neuroblastoma Risk Group Staging</b>	
<b>Stadio</b>	<b>Caratteristiche</b>
Stadio L1	Fattori di rischio radiologici assenti: tumore localizzato che non coinvolge strutture vitali (così come definite dalla lista di IDRF) e confinato ad un compartimento corporeo
Stadio L2	Tumore regionale con uno o più IDRF
Stadio M	Malattia con metastasi a distanza (eccetto casi descritti come stadio Ms)
Stadio Ms	Malattia metastatica in bambini di età inferiore a 18 mesi, con metastasi limitata a cute, fegato e/o midollo osseo (il coinvolgimento midollare deve essere limitato a meno del 10% del totale delle cellule nucleate su striscio o biopsia)

Lo stadio classificato come L1 identifica la malattia localizzata ad un singolo compartimento (collo, torace, addome, bacino) in assenza di IDRF, mentre lo stadio L2 include la presenza di uno o più IDRF.

Gli stadi con malattia metastatica sono classificati come M, con malattia situata lontano dal sito primario, o Ms, in cui la malattia metastatica si manifesta nei bambini di età <18 mesi limitatamente a fegato, pelle e midollo osseo.

Lo stadio della malattia è associato con altri fattori prognostici, tra cui l'età alla diagnosi, l'istologia e l'assetto genomico (compresi l'amplificazione MYCN, lo stato di 11q e la ploidia) per definire i gruppi a rischio di pretrattamento.

La combinazione degli stadi con i vari fattori prognostici ha permesso di raggruppare tutti i pazienti in 17 categorie di rischio divise tra: rischio molto basso, basso, intermedio e alto, le quali permettono di definire i protocolli di trattamento più idonei, come rappresentato nella *Tabella 4.* (9)

<b>Tabella 4. Classificazione per fattori di rischio secondo l'INRG</b>						
<b>Stadio INRG</b>	<b>Età (mesi)</b>	<b>Istologia</b>	<b>MYCN</b>	<b>Aberrazioni 11q</b>	<b>Ploidia</b>	<b>Gruppo di rischio</b>
L1/L2		GN maturing/GNB intermixed				Molto basso
L1		Tutte tranne GN maturing e GNB intermixed	NA			Molto basso
			Ampl			Alto
L2	<18	GN maturing/GNB intermixed	NA	No		Basso
				Si		Intermedio
	≥18	GNB nodulare con NB differenziante e NB differenziante	NA	No		Basso
				Si		Intermedio
		GNB nodulare scarsamente differenziato o indifferenziato/ NB indifferenziato	NA			Intermedio
				Ampl		Alto
M	<18		NA		Iperdiploide	Basso
	<12		NA		Diploide	Intermedio
	12-18		NA		Diploide	Intermedio
	<18		Ampl			Alto
	≥18					Alto
Ms	<18		NA	No		Molto basso
				Si		Alto
			Ampl			Alto

I neuroblastomi a rischio molto basso e a basso rischio, ovvero gli stadi L1, L2 e Ms con caratteristiche genomiche favorevoli (MYCN non amplificato, assenza di aberrazioni di 11q e assenza di ploidia), rappresentano quasi il 50% di tutti i neuroblastomi di nuova diagnosi. Sono pazienti a prognosi ottima. (3)

Il neuroblastoma a rischio intermedio si riferisce alla malattia di stadio L2 senza amplificazione MYCN, ma con aberrazioni del cromosoma 11q, stadio M in pazienti <18 mesi di età con caratteristiche genomiche sfavorevoli quali diploidie.

La maggior parte (> 80%) dei pazienti con neuroblastoma ad alto rischio ha un'età >18 mesi con malattia stadio M, i cui tumori presentano caratteristiche biologiche sfavorevoli (MYCN amplificato, patologia sfavorevole e/o diploide). (3)

Il restante 15-20% dei pazienti ad alto rischio ha qualsiasi età e stadio della malattia con amplificazione MYCN.

Da questi dati si evince che l'amplificazione di MYCN comporta la collocazione del paziente in una classe di rischio molto alto, incidendo negativamente sulla prognosi. Infatti, il tasso di sopravvivenza a 5 anni dei pazienti ad alto rischio è circa il 35%.

#### 1.1.4. Terapia

A parte i casi che richiedono solo osservazione, diverse modalità terapeutiche vengono combinate in base al relativo gruppo di rischio:

- Chirurgia: viene utilizzata in diversi momenti diagnostico-terapeutici come:
    - Fase di esordio di malattia per eseguire una biopsia
    - Chirurgia primaria all'esordio, quando le caratteristiche della massa consentano l'asportazione radicale.
- Può essere eseguita in "open" per le neoplasie di voluminose dimensioni, o di particolare fragilità o essere mininvasiva. La scelta della procedura chirurgica dipende dalle condizioni generali del paziente (peso, età), dalle caratteristiche della neoplasia (dimensione, localizzazione) e dai fattori di rischio chirurgici presenti (coinvolgimento vascolare, nervoso o di organi limitrofi)

- Chirurgia delle metastasi: chirurgia differita sul tumore primitivo dopo chemioterapia con l'obiettivo dell'asportazione radicale
  - Chirurgia della recidiva
  - Chirurgia delle complicanze
- Radioterapia: il neuroblastoma è un tumore radiosensibile. Questa tecnica viene utilizzata sia con scopo adiuvante negli alti rischi, sia come terapia palliativa in caso di disseminazione metastatica, compressione midollare o in corso di recidiva; viene invece evitata nei pazienti a basso rischio a causa dei potenziali effetti tardivi nonostante le nuove tecnologie che offrono la possibilità di minimizzare la dose in un campo da irradiare sempre più specifico e ristretto
  - Chemioterapia di induzione: secondo lo schema *RAPID COJEC* che comprende vari chemioterapici:
    - Cisplatino (da cui deriva la C del nome dello schema)
    - Vincristina (O)
    - Carboplatino (J)
    - Etoposide (E)
    - Ciclofosfamide (C)

I seguenti farmaci vengono somministrati ogni 10 giorni con diverse associazioni e con dosi elevate per interferire con il recupero delle cellule tumorali e per evitare fenomeni di resistenza a farmaci.

Lo schema ha una durata di 10 settimane indipendentemente sia dalla conta dei neutrofili e delle piastrine, che dalla presenza di febbre non di origine infettiva (10)

- Terapia mieloablativa con trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche (TCSEa): viene utilizzata in pazienti ad alto rischio con regimi di condizionamento contenenti Melfalan

- Terapia di differenziazione: nonostante l'efficacia della chemioterapia mieloablative con successivo TCSEa nei neuroblastomi ad alto rischio, il 50% dei pazienti recidiva mesi o anni dopo il trapianto. Per questo motivo l'aggiunta di acido *cis*-retinoico ha mostrato un miglioramento dell'*event-free survival*. L'acido *cis*-retinoico è un farmaco somministrato oralmente che può ridurre la proliferazione cellulare e indurre la differenziazione delle cellule del neuroblastoma nei pazienti ad alto rischio (3)
- Immunoterapia: il disialoganglioside GD2 è un glicosfingolipide, ovvero un lipide di membrana altamente espresso in tumori di origine ectodermica quali neuroblastoma e melanomam, motivo per cui vengono applicati anticorpi monoclonali anti GD2 (*Dinutuximab*) che mediano la lisi cellulare, associati o meno a somministrazione di citochine quali IL-2 e/o GMCSF (11)

### **Trattamento per gruppo di rischio**

Il trattamento iniziale di pazienti affetti da neuroblastoma viene stabilito da un team multidisciplinare e dipende principalmente dal gruppo di rischio.

Si va dalla semplice osservazione di alcuni pazienti a “rischio molto basso” fino a terapie multimodali per quelli con malattia ad “alto rischio”.

- Rischio molto basso:** Per i pazienti di età <18 mesi con stadi L1, L2 o Ms, senza amplificazione di MYCN, con caratteristiche genomiche favorevoli, in assenza di sintomi clinici o progressione del tumore, può essere sufficiente il follow up senza una chirurgia citoriduttiva. L'osservazione include il monitoraggio mediante esame obiettivo, valutazione dei livelli di catecolamine urinarie e imaging con ecografia o RM inizialmente a 6 e 12 settimane, poi ogni 3 mesi per il primo anno e ogni 6 mesi dal secondo anno. In alcuni casi è richiesta invece la resezione chirurgica, non necessariamente completa, dal momento che la progressione del residuo del tumore è solitamente autolimitante. (2)

- b. **Basso rischio:** La strategia di trattamento dipende dalle manifestazioni cliniche.
- pazienti con NB stadio L1, MYCN non amplificato: trattati con resezione chirurgica del tumore primitivo.
  - pazienti con NB stadio L2 o MS, MYCN non amplificato, età < 18 mesi: trattati con alcuni cicli di chemioterapia adiuvante; in caso di pazienti asintomatici si può attuare la sola osservazione clinica.
- c. **Rischio Intermedio:** per pazienti affetti da neuroblastoma inoperabile, età superiore ai 18 mesi, con MYCN non amplificato, si identificano due strategie in base alla presenza o meno di metastasi.
- pazienti L2, MYCN non amplificato, ma presenza di aberrazioni cromosomiche come 11q: viene eseguita chemioterapia per permettere la resezione completa, o quasi, di un tumore considerato inoperabile alla diagnosi.
  - pazienti con stadio M età < 18 mesi, MYCN non amplificato: la terapia consiste in 4-8 cicli di chemioterapia e resezione del tumore primitivo.
- (12)
- d. **Alto Rischio:** pazienti con stadio L1, L2, M e MS di qualsiasi età con MYCN amplificato e pazienti di stadio M con età > 18 mesi. L'approccio terapeutico consta delle seguenti fasi:
- a) chemioterapia di induzione di combinazione per ridurre la massa tumorale primitiva e le metastasi
  - b) intervento chirurgico
  - c) chemioterapia mieloablativa ad alte dosi e trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche per eliminare le cellule tumorali residue.
  - d) terapia di mantenimento con anticorpo monoclonale anti-GD2 e immunoterapia con citochine come IL2
  - e) terapia differenziante con acido *cis*-retinoico



I pazienti con neuroblastoma sono soggetti a tossicità correlata alla malattia e al trattamento.

Quasi tutti i pazienti trattati per neuroblastoma, ma specialmente i pazienti ad alto rischio, presentano una tossicità acuta dovuta al trattamento, come grave mielosoppressione solitamente transitoria, disfunzione renale indotta da chemioterapia e scarso aumento di peso, che richiede un'integrazione nutrizionale.

Per quanto riguarda l'immunoterapia, che rientra nel trattamento del neuroblastoma ad alto rischio, essa è spesso causa di sintomi quali dolore neuropatico, febbre, diarrea, neutropenia, reazioni cutanee e allergiche e tossicità epatica. La contemporanea somministrazione di IL-2 risulta in alcuni casi mal tollerata dai pazienti, per cui in base alla gravità degli effetti avversi che si presentano può essere interrotta.

Il neuroblastoma si discosta profondamente dagli altri tumori solidi per la sua eterogeneità biologica, ma soprattutto clinica, in quanto possono presentarsi casi che vanno da neoplasia in regressione spontanea a malattia metastatica molto aggressiva e non responsiva alla chemioterapia classica e/o all'immunoterapia.

Come già precedentemente accennato, i nuovi schemi di classificazione dividono i pazienti a seconda del rischio. Nello specifico, quelli con malattia a basso rischio hanno eccellenti tassi di sopravvivenza con la semplice osservazione o con limitati interventi terapeutici. Il tasso di sopravvivenza dei pazienti con malattia a rischio intermedio, trattati principalmente con la chirurgia e la chemioterapia, invece, è migliorato ed ha permesso in alcuni casi di utilizzare marcatori biologici al fine di ridurre ulteriormente la terapia in specifici gruppi di bambini.

Infine, i pazienti con malattia ad alto rischio, che rappresentano circa la metà di tutti i nuovi casi annui di neuroblastoma, necessitano di chemioterapia di induzione, chirurgia, radioterapia, chemioterapia ad alte dosi, trapianto autologo di cellule staminali e immunoterapia. Questa strategia terapeutica aggressiva ha portato un aumento della sopravvivenza libera da eventi ma, nonostante ciò, sono molto frequenti le ricadute e i decessi nei pazienti ad alto rischio, motivo per cui la ricerca si sta concentrando sullo studio delle origini della malattia al fine di trovare nuovi approcci terapeutici.

## **Trattamento della recidiva**

Nei pazienti con neuroblastoma recidivante, la sopravvivenza a 3 anni senza una seconda recidiva della malattia, o senza morte, è possibile in rari casi, nonostante le combinazioni di chemioterapia più recenti siano riuscite a determinare una seconda remissione parziale o completa della malattia.

I trattamenti di salvataggio che attualmente risultano più efficaci per il neuroblastoma recidivante sono: topotecan con ciclofosfamide, irinotecan con temozolomide, 131I-mIBG, combinazioni di terapie a bersaglio molecolare (es. inibitore di ALK) con la chemioterapia. (3)

## **Trattamento delle complicanze**

La compressione a livello del midollo spinale si verifica in circa il 5-10% di tutti i pazienti con neuroblastoma e costituisce un'emergenza medica. È infatti necessario un trattamento immediato per evitare un danno neurologico irreversibile, specialmente se sono presenti sintomi di neuropatia (perdita di sensibilità e funzione motoria, perdita del controllo sfinteriale, cecità etc.).

Le opzioni terapeutiche comprendono il trattamento sintomatico, con l'utilizzo di corticosteroidi ad alte dosi, oppure chemioterapia o intervento neurochirurgico (laminectomia o laminotomia). (3)

La Sindrome Opsoclono Mioclono (OMS) è una sindrome debilitante, associata a un alto tasso di compromissione neurologica a lungo termine. Alla base vi è un meccanismo autoimmune, per cui il trattamento indicato è di tipo immunosoppressivo. Vengono usati l'ormone adenocorticotropo (o corticotropina), steroidi ad alte dosi, ciclofosfamide,  $\gamma$  globulina endovenosa, Rituximab, agenti immunomodulatori come micofenolato o, nei casi gravi, plasmferesi. (3)

Nonostante l'efficacia dell'immunosoppressione nel ridurre la gravità dei sintomi, alcuni pazienti presentano scarso recupero neurologico. Infatti, la maggior parte dei pazienti affetti da questa sindrome presenta deficit evolutivi e comportamentali a lungo termine.

## **Follow-up e complicanze a lungo termine**

I bambini con diagnosi di neuroblastoma vanno inseriti in un programma di follow-up per individuare tempestivamente un'eventuale recidiva.

Ogni segno o sintomo indicativo di recidiva va valutato con visita, dosaggio delle catecolamine urinarie, esami ematochimici seguiti poi da uno staging completo con TC/RM, scintigrafia <sup>123</sup>I-mIBG e valutazione osteomidollare. (5)

I controlli saranno più ravvicinati nei primi 2 anni successivi alla conclusione della terapia, durante i quali sono più frequenti le recidive, a maggior intervallo tra i 3-5 anni, e ancor più dilazionati successivamente dal momento che il tasso di recidiva è basso dopo 5 anni.

Il follow up a lungo termine viene eseguito sistematicamente, anche perché i bambini trattati per neuroblastoma hanno un tasso di mortalità e morbilità più elevato rispetto alla popolazione di pari età, con una compromissione della qualità di vita e difficoltà psicosociali (es. problemi nell'apprendimento).

Le complicanze a lungo termine più frequenti sono i deficit endocrini come ipotiroidismo, carenza di ormone della crescita (GH), problemi gonadici e di fertilità, osteoporosi, etc, ma anche perdita dell'udito a causa dell'uso di farmaci derivati dal platino, complicanze renali e rischio di tumori secondari. (12)

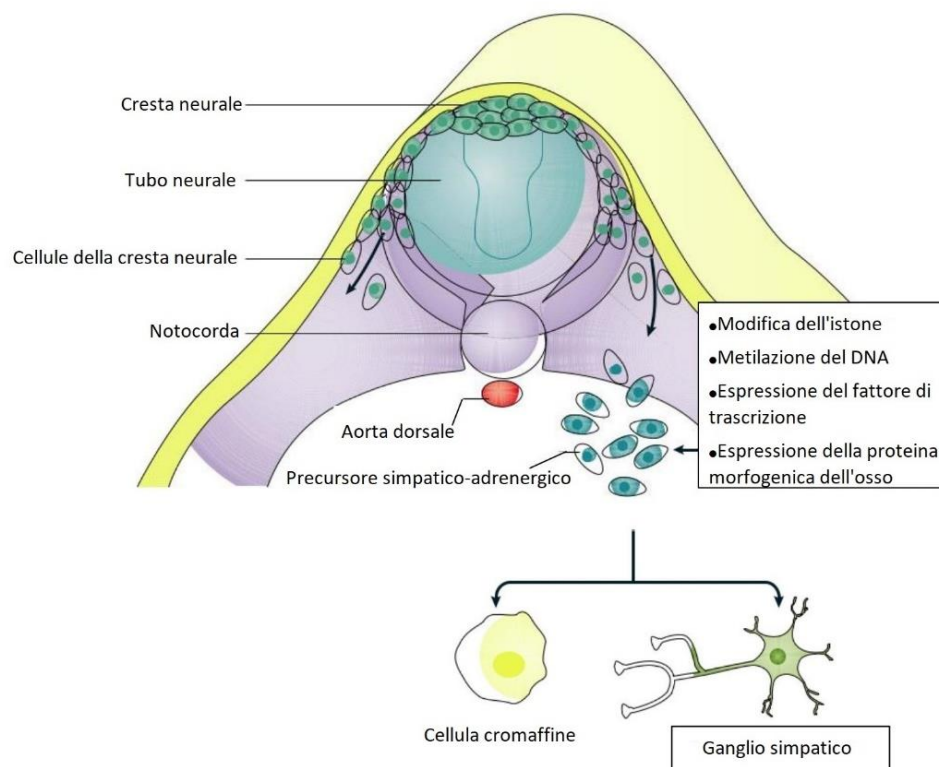
## 1.2. Patogenesi e genetica del Neuroblastoma

Le nuove prospettive e la valutazione prognostica del neuroblastoma si basano su una comprensione sempre più dettagliata dello sviluppo del sistema simpatico e surrenalico, della tumorigenesi, della patogenesi, ma soprattutto delle alterazioni genetiche presenti nel tumore. (13)

### 1.2.1. Patogenesi molecolare

Il neuroblastoma è un tumore del periodo evolutivo che origina dal sistema nervoso simpatico periferico a livello dei gangli simpatici o della midollare del surrene.

Durante l'embriogenesi, cellule della cresta neurale, un tessuto embriologico derivante dalla porzione dorsale del tubo neurale, migrano verso l'aorta dorsale, dove si differenziano in cellule progenitrici che danno origine alle cellule del sistema nervoso simpatico, inclusi i gangli e la ghiandola surrenale come rappresentato nella *Figura 1*. (3)



**Figura 1. Migrazione e differenziazione cellulare della cellula staminale.** Durante lo sviluppo le cellule della cresta neurale migrano dal tubo neurale e vanno incontro a differenziazione attraverso programmi trascrizionali ed epigenetici. La differenziazione è in cellule dei gangli simpatici o in cellule cromaffini.

Attraverso una serie complessa di modificazioni epigenetiche e trascrizionali avviene questo processo di migrazione e, successivamente, di differenziazione, che comporta la modifica dell'istone, la metilazione del DNA e l'espressione delle proteine morfogenetiche ossee e dei fattori di trascrizione. I fattori di trascrizione attivati includono quelli della famiglia SOX, che a loro volta attivano regolatori trascrizionali di proliferazione e differenziazione cellulare. (3)

Un'alterazione di questo processo di maturazione e differenziazione può predisporre i precursori multipotenti della cresta neurale alla trasformazione maligna. (13)

La stragrande maggioranza dei neuroblastomi insorge a partire dalla midollare surrenale e dai gangli paraspinali addominali, mentre una piccola parte proviene dai gangli simpatici nel torace, nella testa/collo e nella pelvi.

La sopravvivenza a lungo termine dipende principalmente dal grado di differenziazione cellulare, con pazienti che presentano tumori con cellule totalmente indifferenziate, simili ai progenitori della cresta neurale e con prognosi nettamente peggiore, e pazienti con tumori ben differenziati che hanno un esito più favorevole.

L'ampia eterogeneità clinica e patologica, ma soprattutto molecolare di questa neoplasia, riflette la biologia evolutiva unica della cresta neurale, per cui può essere di grande aiuto nello studio della patogenesi del neuroblastoma nonché nell'identificazione di molecole e percorsi specifici e biologicamente mirati di trattamento. (13)

Diverse evidenze hanno dimostrato un ruolo dell'ipossia nello sviluppo del tumore, in particolar modo nella differenziazione delle cellule tumorali, nella sopravvivenza e nella diffusione metastatica.

L'esposizione locale o sistemica a bassa concentrazione di ossigeno è stata collegata allo sviluppo del neuroblastoma in quanto la condizione ipossica del microambiente tumorale porta ad un'alterazione della regolazione di più processi cellulari, come la proliferazione, la sopravvivenza e l'invasione cellulare, che influiscono in modo determinante sull'aggressività del tumore e sulla resistenza alla terapia.

Un'analisi dell'espressione genica ha dimostrato come l'ipossia provochi una risposta generale di adattamento delle cellule tumorali, con perdita del fenotipo neuronale a favore di un aumento dei geni delle cellule staminali. (14)

Il fattore inducibile dell'ipossia (HIF) è stato in particolar modo associato ad un aumento dell'invasione, della tumorigenicità nonché ad un fenotipo più aggressivo, poiché appunto porta ad un mantenimento dello stato indifferenziato delle cellule, simile ai precursori della cresta neurale. (14)

Secondo più recenti studi gli RNA non codificanti quali i microRNA (miRNA), i long non-coding RNA (lncRNA) e i Piwi-interacting RNA (piRNA), sono regolatori trascrizionali essenziali delle cellule staminali, dello sviluppo e della differenziazione della cresta neurale. Molti di questi microRNA sono alterati nei neuroblastomi aggressivi poiché bloccano l'attività della p53 e promuovono la migrazione di cellule tumorali in sedi distanti producendo metastasi.(13)

### 1.2.2. Neuroblastoma familiare

Nonostante il neuroblastoma sia un tumore principalmente sporadico, in una piccola percentuale di casi, ovvero in circa l'1-2% dei casi, è ereditato in modo autosomico dominante, rientrando in quello che viene definito neuroblastoma familiare. (15)

La neoplasia tende a presentarsi in giovane età, spesso con una storia familiare di parenti affetti dallo stesso tumore e non di rado sono presenti siti primari multipli (es. neuroblastoma surrenale bilaterale). (15)

Le famiglie affette da neuroblastoma ereditario, sebbene siano rare, mostrano spesso una significativa variabilità clinica nella gravità della malattia, presentando tumori ad alto e basso rischio. Un'attenta indagine di queste famiglie ha prodotto importanti informazioni sulla tumorigenesi del neuroblastoma, nonché permesso di identificare percorsi per nuove terapie mirate.

Il primo gene di predisposizione al NB ad essere scoperto è stato *PHOX2B*. Nel 2004, l'evidenza di un'associazione del neuroblastoma con altre malformazioni congenite di derivazione dalla cresta neurale, quali la malattia di Hirschsprung (HSCR) e la sindrome congenita dell'ipoventilazione centrale (CCHS), determinate dalle mutazioni *PHOX2B*, ha permesso di identificare questo come gene predisponente al neuroblastoma ereditario. (16)

Il gene *PHOX2B* codifica per un fattore di trascrizione necessario per lo sviluppo del sistema nervoso simpatico, in particolar modo permette la differenziazione delle cellule

della cresta neurale in neuroni noradrenergici. È stato stimato che le mutazioni germinali nel gene *PHOX2B* sono presenti in circa il 10% della malattia ereditaria e sono state osservate fino al 2% dei casi di NB sporadici. (16)

Successivamente è stato identificato un altro gene, più precisamente un oncogene, di predisposizione al neuroblastoma, Anaplastic lymphoma kinase (*ALK*), che è mutato anche in alcuni tumori dell'adulto. Si tratta di un recettore tirosin-chinasi che, mutato nel dominio tirosin-chinasi, può essere attivato mediante fosforilazione costitutiva. Per questo motivo le mutazioni a carico di *ALK* sono state le prime mutazioni oncogeniche e non oncosoppressive a causare un tumore pediatrico familiare e mutazioni di *ALK* sono presenti in circa l'80 % delle famiglie con neuroblastoma. (15)

Sono state identificate tre mutazioni missenso germinali a carico del dominio tirosin-chinasico presenti nella maggior parte dei casi familiari: R1192P, R1275Q e G1128A. (17)

Tali mutazioni hanno una penetranza fenotipica incompleta, ovvero la presenza di una mutazione non implica obbligatoriamente che gli individui affetti svilupperanno un neuroblastoma. Fa eccezione la mutazione R1275Q che porta ad una penetranza quasi completa nelle famiglie affette, mentre G1128A è correlata ad una probabilità di circa il 25% di sviluppare un neuroblastoma. (15)

Attualmente sono disponibili test genetici sia per *ALK* che per *PHOX2B* al fine di identificare la suscettibilità genetica del singolo individuo, ma anche di informare le famiglie per un'eventuale decisione sullo screening degli altri membri. (12)

Tuttavia, ci sono alcune famiglie che non mostrano mutazioni in *ALK* o *PHOX2B*, quindi la ricerca di ulteriori geni coinvolti nel neuroblastoma familiare ha portato alla scoperta di *KIF1Bβ*, un oncosoppressore coinvolto in tumori della cresta neurale come il neuroblastoma e il feocromocitoma. Mutazioni germinali a carico di questo gene sembrano fornire un vantaggio di sopravvivenza per le cellule progenitrici neuronali con potenziale maligno, consentendo lo sviluppo di una neoplasia maligna. (17)

Mentre le alterazioni dei geni sopra descritti sono state identificate in famiglie con una predisposizione specifica per i tumori neuroblastici, vi sono alcune sindromi in cui è aumentato il rischio di sviluppare neoplasie, tra le quali il neuroblastoma. Tra queste rientrano alcune RASopatie come la sindrome di Costello, la sindrome di Noonan e la

Neurofibromatosi di tipo I, visto il coinvolgimento delle proteine RAS nella differenziazione e maturazione delle cellule della cresta neurale. (17)

Altre sindromi da predisposizione sono la *Sindrome Li-Fraumeni*, caratterizzata da una mutazione del gene TP53 in grado di esporre il paziente ad un rischio fino a 25 volte maggiore di sviluppare una neoplasia, la *Sindrome Rapid-onset Obesity with Hypothalamic dysregulation, Hypoventilation, and Autonomic Dysregulation (ROHHAD)* caratterizzata da obesità a insorgenza rapida, disfunzione ipotalamica, ipoventilazione e disfunzione autonoma e frequentemente associata a tumori della cresta neurale, la *Sindrome di Beckwith-Wiedemann*, caratterizzata da emiipertrofia, macroglossia, difetti della parete addominale della linea mediana e macrosomia con predisposizione per epatoblastoma, tumore di Wilms e neuroblastoma (rischio 2-5%) e infine *l'anemia di Fanconi*, una forma rara di pancitopenia caratterizzata da malformazioni e aumentata incidenza di tumori quali leucemie e tumori del testa-collo. (17)

Nonostante i significativi progressi nella comprensione dei fattori genetici, l'ereditarietà del neuroblastoma rimane solo parzialmente compresa, dal momento che circa il 15% dei casi familiari rimane irrisolto.

Un'indagine approfondita attraverso il sequenziamento genico potrebbe fornire nuove informazioni sui fattori genetici che determinano la predisposizione al neuroblastoma, comprese le interazioni gene-gene, gene-ambiente e fattori epigenetici. (16)

### 1.2.3. Neuroblastoma sporadico

Sebbene alcuni tumori possano essere attribuibili a specifiche alterazioni genetiche ereditate, come descritto nel neuroblastoma familiare per i geni *PHOX2B* e *ALK*, la maggior parte dei tumori è il risultato di un'interazione tra fattori genetici e ambientali. Si ritiene che i fattori ambientali siano responsabili di circa un terzo di tutti i tumori a livello globale, ma per quanto riguarda il neuroblastoma non sembrano avere un ruolo determinante per il suo sviluppo. (17)

La difficoltà a comprendere la tumorigenesi del neuroblastoma sta nel fatto che solo un piccolo sottogruppo di tumori ha una mutazione oncogenica identificabile. Infatti, attraverso il sequenziamento dell'esoma e del genoma di campioni di tessuto di neuroblastoma, è stata riscontrata una bassa conta delle mutazioni somatiche, per cui non



esiste un singolo evento di mutazione genetica in grado di spiegare lo sviluppo di tutti i casi di neuroblastoma sporadico.

Tali risultati sollevano la questione fondamentale del perché alcuni bambini sviluppino il neuroblastoma e quali siano i fattori genetici predisponenti che possono essere presenti in questi pazienti.

L'introduzione di studi di associazione a livello del genoma, (GWAS) ha consentito di identificare le prime evidenze di variazioni geniche tra gli individui in esame, in particolare modo di polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP).

Nel 2008 il primo GWAS su tumore pediatrico è stato eseguito sul neuroblastoma ed ha permesso di dimostrare che esistono almeno una dozzina di alleli polimorfici altamente significativi che possono influenzare la formazione del neuroblastoma, malgrado ogni associazione abbia un modesto effetto individuale sull'insorgenza della neoplasia, mentre più associazioni possono cooperare per promuovere la tumorigenesi. (18)

Attraverso GWAS si è potuto inoltre identificare un locus di suscettibilità nel cromosoma 6p22 che ospita SNP associati a un rischio aumentato di neuroblastoma, in particolare ad alto rischio. (19)

Questo studio ha identificato tre varianti nel locus 6p22, che sono state successivamente mappate sui geni *CASC-15* e *NBAT-1* e identificate come RNA lunghi non codificanti. (17)

Oltre a confermare il locus 6p22, sono stati identificati diversi nuovi SNP a livello del locus 2q35 a livello degli introni del gene *BARD1*, il quale risulta avere un'elevata attività oncogenica, in quanto induce la proliferazione e l'invasività delle cellule tumorali. (18)

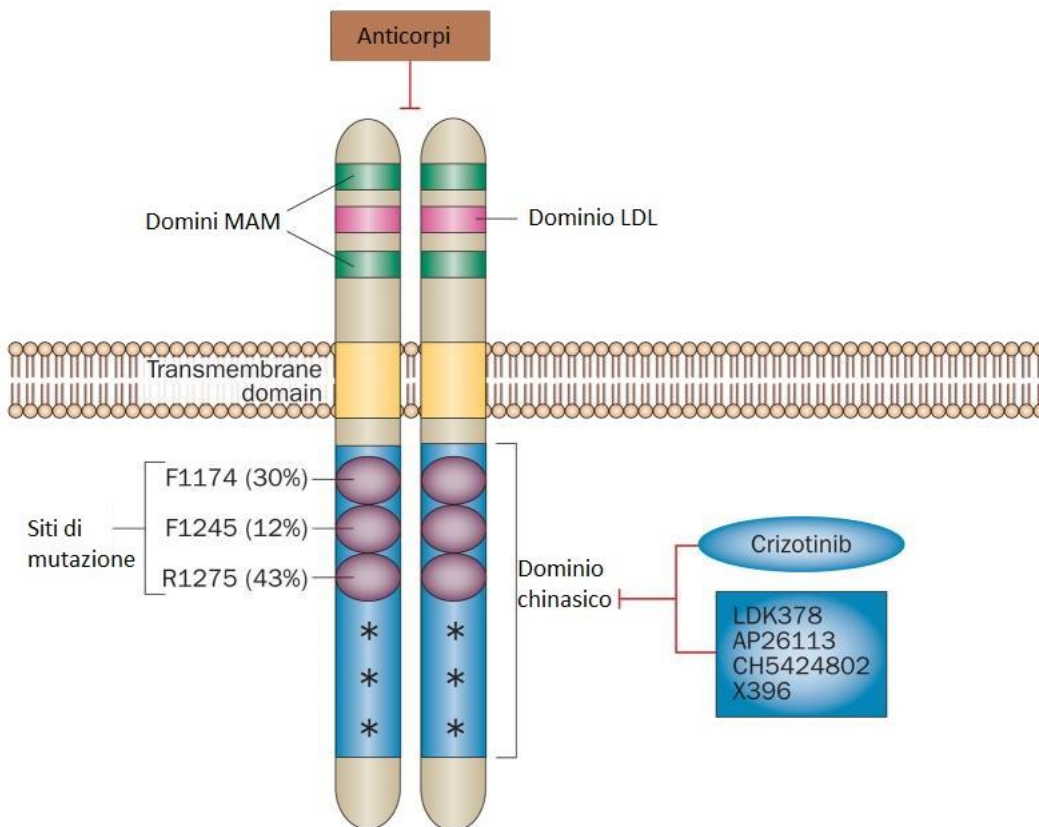
Questa continua ricerca derivante dal risultato di uno studio GWAS costituisce una chiara prova del concetto secondo cui attraverso GWAS si può identificare la patogenesi, nonché la biologia del neuroblastoma. (17)

### 1.2.4. Alterazioni genetiche

Nonostante le ultime scoperte, le mutazioni dei loci predisponenti del GWAS sono relativamente rare nel neuroblastoma sporadico, come anche le mutazioni con perdita di funzione del gene PHOX2B, frequentemente riscontrato nei neuroblastomi familiari, ma solo nel 4% dei casi di neuroblastoma spontaneo ad alto rischio.

### ALK

Il gene ALK, mutato in quasi tutti i casi di neuroblastoma familiare, risulta essere mutato nei neuroblastomi sporadici in una percentuale che va dal 7% al 10% dei casi.(18)



**Figura 2. ALK e mutazioni.** Il recettore ALK presenta domini tirosin chinasi che necessitano di essere fosforilati per la sua attivazione. Vi sono alcune mutazioni in grado di attivare costitutivamente il recettore.

Questi dati suggeriscono che ALK, costitutivamente attivato mediante fosforilazione, è uno dei principali motori oncogeni nel NB, motivo per cui risulta essere un bersaglio naturale per la terapia innovativa con inibitori selettivi molecolari, quali Crizotinib. (20)

Le mutazioni somatiche di *ALK* più comuni nei casi sporadici di neuroblastoma si trovano nelle posizioni R1275 (la più frequente), F1174 e F1245. Queste sono mutazioni missenso a base singola attivanti il dominio tirosin-chinasico di ALK come si può vedere nella *Figura 2*. (21)

Questo recettore tirosin-chinasico è inoltre coinvolto nello sviluppo di numerosi altri tumori, quali il linfoma a grandi cellule anaplastico (ALCL), un tumore tipico dell'infanzia, e il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC). (21)

## MYCN

MYCN svolge un ruolo importante nella tumorigenesi del neuroblastoma e viene usato come biomarcatore per la stratificazione del rischio, in quanto è stato dimostrato che la sua amplificazione, definita come più di 10 copie, fa rientrare automaticamente il paziente nella categoria *ad alto rischio*. (13)

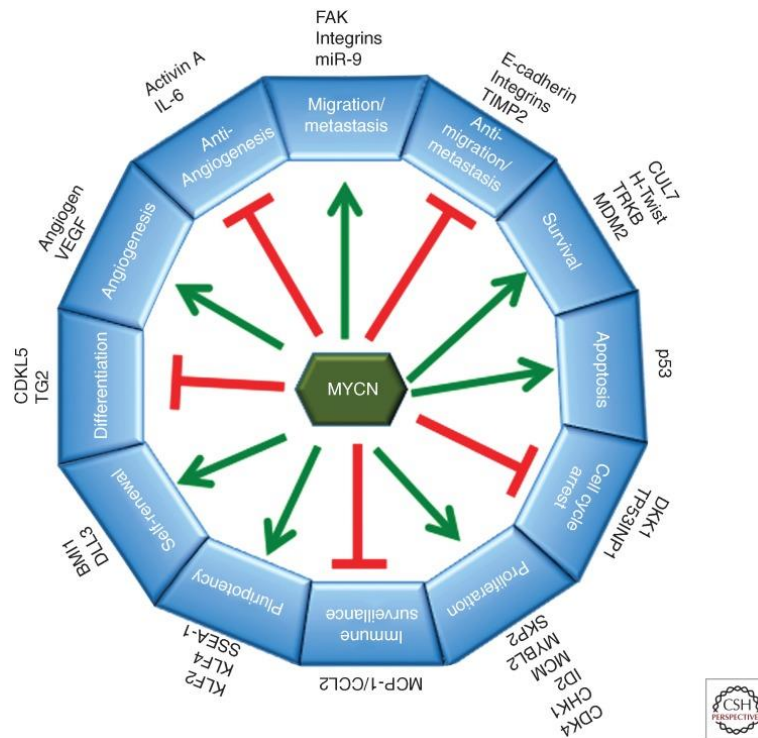
È stato dimostrato che i neuroblastomi più aggressivi sono caratterizzati dall'amplificazione di MYCN, che si riscontra in circa il 20% dei tumori, la quale è solitamente associata a perdita cromosomica segmentale del braccio corto distale del cromosoma 1 (1p) e scarsa sopravvivenza del paziente, in quanto sembra essere responsabile dello stadio avanzato del tumore e della progressione della malattia (indipendentemente dallo stadio della malattia e dall'età alla diagnosi). (3)

MYCN è un oncogene che codifica per un fattore di trascrizione in grado di interagire direttamente con il DNA, una sua alta espressione viene rilevata a livello delle cellule della cresta neurale post-migratoria ed è importante per la regolazione della migrazione e del normale sviluppo simpatico surrenale.

Da alcuni studi si è evinto che, nel corso del differenziamento in neuroni simpatici, i livelli di MYCN nelle cellule diminuiscono gradualmente, suggerendo che la maturazione è indipendente dall'espressione di MYCN. (18)

Si pensa che lesioni preneoplastiche possano manifestarsi in precursori simpatico-surrenali che non hanno ricevuto segnali determinanti il differenziamento in cellule neuronali o cromaffini.

MYCN infatti è coinvolto sia nella proliferazione cellulare che nell'apoptosi, perciò la sua espressione persistente durante la maturazione dei precursori potrebbe comportare il blocco della cascata apoptotica e una proliferazione incontrollata che porta allo sviluppo del neuroblastoma.



**Figura 3. MYCN e funzioni cellulari.** MYCN svolge innumerevoli funzioni interagendo con varie molecole e promuovendo alcune vie cellulari e inibendone altre.

Tutte queste considerazioni fanno pensare a MYCN come ad uno dei principali driver oncogenici del NB. (18)

MYCN svolge diversi ruoli nella malignità e nel mantenimento dello stato indifferenziato, può infatti attivare la trascrizione di geni coinvolti nella disseminazione delle metastasi, nella sopravvivenza, nella proliferazione, nella pluripotenza e nell'angiogenesi, mentre può sopprimere l'espressione di geni che promuovono la differenziazione, l'arresto del ciclo cellulare e la sorveglianza immunitaria.

Parallelamente è anche in grado di indurre apoptosi coinvolgendo p53, un fattore di trascrizione con funzione oncosoppressiva che regola il ciclo cellulare. (22)

Per quanto riguarda la capacità di indurre metastasi, le quali si verificano circa nel 50% dei pazienti con neuroblastoma alla diagnosi con frequente diffusione al midollo osseo (70%), osso (55%), linfonodi (30%), fegato (30%) e cervello (18%), MYCN contribuisce a tutti gli aspetti della metastatizzazione: adesione, motilità e invasione. Nello specifico, la down-regolazione delle integrine  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ , controllata da MYCN, promuove il distacco delle cellule dalla matrice extracellulare consentendo la migrazione e l'invasione.

MYCN ha un ruolo importante nell'elevata vascolarizzazione nel neuroblastoma, che è correlata con una scarsa sopravvivenza e con un'aumentata diffusione in quanto facilita la produzione di fattori di crescita delle cellule endoteliali e previene il rilascio di inibitori dell'angiogenesi. L'associazione dell'amplificazione di MYCN con l'angiogenesi suggerisce la terapia antiangiogenica come un possibile approccio al neuroblastoma MYCN amplificato. (22)

Come precedentemente detto, il neuroblastoma deriva dalle cellule della cresta neurale, che possiedono le caratteristiche di autorinnovamento e pluripotenza. MYCN è probabilmente coinvolto nella regolazione di entrambi gli aspetti, in quanto è in grado di promuovere uno stato di tipo staminale, bloccando la differenziazione ed esprimendo fattori di pluripotenza. (22)

L'effetto tumorigenico meglio caratterizzato di MYCN è quello di promuovere la proliferazione e la progressione del ciclo cellulare probabilmente attraverso la down-regolazione della proteina nucleare inducibile TP53 e l'up-regolazione della checkpoint chinasi 1 (CHK1), un importante regolatore delle fasi del ciclo cellulare S e G<sub>2</sub>/M, che è stata suggerita come meccanismo attraverso il quale il neuroblastoma MYCN amplificato diventa resistente alla chemioterapia standard. (22)

Da questi dati si evince che MYCN attivi sia la proliferazione che l'apoptosi.

Il fatto quindi, che MYCN promuova una risposta proliferativa netta dipende dai fattori apoptotici cooperanti, quali la proteina antiapoptotica BCL2.

Al contrario, le mutazioni di proteine proapoptotiche come p53 si verificano più comunemente nel neuroblastoma alla ricaduta, a conferma dell'ipotesi che tali mutazioni possano insorgere in risposta alla chemioterapia citotossica, conferendo refrattarietà alla terapia.

Infine, è importante sottolineare che, a causa della vicina localizzazione sul cromosoma 2p, i geni ALK e MYCN possono essere co-amplificati. (3)

#### ALTERAZIONI DEL NUMERO DI COPIE CROMOSOMICHE SEGMENTALI.

Quasi tutti i neuroblastomi ad alto rischio mostrano alterazioni ricorrenti del numero di copie cromosomiche segmentali.

Il guadagno di 17q è stato mostrato in oltre il 50% dei casi, mentre la perdita di 1p è stata dimostrata in circa un terzo dei casi. Entrambi sono correlati all'amplificazione di MYCN e ad una prognosi sfavorevole. (3)

La perdita di 11q è stata dimostrata in un terzo dei casi di neuroblastoma ad alto rischio; altre alterazioni cromosomiche segmentali comuni includono guadagni di 1q e 2p e perdita di 3p, 4p e 14q, ma il rischio di prognosi sfavorevole associata a queste alterazioni del numero di copie è meno conosciuto rispetto alle associazioni con 1p, 11q e 17q. (3)

#### ATRX

Le mutazioni di ATRX sono piuttosto comuni nel NB sporadico e vi è una relazione statisticamente significativa tra queste mutazioni e l'età alla diagnosi: si verificano nel 17% dei bambini di età compresa tra 18 mesi e 12 anni con malattia in stadio IV e nel 44% dei pazienti di età superiore ai 12 anni con una prognosi sfavorevole, mentre nei bambini di età inferiore ai 18 mesi in stadio IV non sono state identificate mutazioni ATRX con una prognosi migliore rispetto a quelli di età superiore. (23)

ATRX codifica per un'elicasi ATP-rimodellante la cromatina che rientra nel complesso di proteine responsabili di rendere il DNA accessibile durante trascrizione e replicazione (18) e funzionalmente è anche coinvolta nella regolazione della lunghezza dei telomeri, suggerendo importanti ruoli nella trasformazione cellulare. (13)

Le mutazioni ATRX sono associate al ritardo mentale legato all'X (XLMR) e alle sindromi  $\alpha$ -talassemiche, suggerendo che ATRX funzioni in vari processi di sviluppo, tuttavia nei bambini con XLMR non si è osservato alcun aumento di incidenza di neuroblastoma, indicando che le singole mutazioni a carico di ATRX non siano sufficienti per indurre una trasformazione neoplastica. (18)

Infine, si sa ben poco su come ATRX contribuisca allo sviluppo o alla differenziazione delle cellule simpatiche e della surrenale.

## POLIMORFISMI LIN28B

Gli alleli polimorfici all'interno del locus LIN28B sono fortemente associati allo sviluppo del neuroblastoma ad alto rischio, comunemente si tratta di una sovraespressione, più raramente di un'amplificazione. (3)

LIN28B regola i processi di sviluppo e la proliferazione delle cellule della cresta neurale modulando i microRNA della famiglia let-7. Non si conosce esattamente il suo ruolo nello sviluppo neoplastico, ma sono state identificate aberrazioni genomiche e un'ampia sovraespressione di IN28B nel neuroblastoma ad alto rischio rispetto ad altre entità tumorali e a tessuti normali. (24)

Un'espressione elevata di IN28B risulta essere un fattore di rischio indipendente per esiti avversi nel neuroblastoma.

Attraverso la repressione dei miRNA della famiglia let-7, aumenterebbero i livelli di espressione della proteina MYCN nelle cellule del neuroblastoma con successivo blocco della differenziazione dei neuroblasti sani e la formazione di cellule neoplastiche. (24)

Secondo questo modello il neuroblastoma originerebbe dalla regolazione aberrante delle principali proteine dello sviluppo.

Al momento vi sono però molti studi contraddittori che cercano di approfondire il ruolo di LIN28B e di dare una risposta circa il suo reale coinvolgimento in termini di sviluppo neoplastico.

## RNA NON CODIFICANTI

Gli RNA non codificanti tra cui i microRNA, lncRNA e piRNA, sono regolatori trascrizionali essenziali della biologia delle cellule staminali, dello sviluppo e della differenziazione della cresta neurale. (13)

In particolar modo i miRNA sono piccole molecole di RNA a singolo filamento non codificanti lunghe circa 19-22 nucleotidi che regolano il 60% dell'espressione genica a

livello post-trascrizionale. Essi possono causare la degradazione degli mRNA o inibire la loro traduzione, svolgendo quindi un ruolo importante nella normale crescita e nello sviluppo. (25)

Diversi studi hanno identificato nei profili alterati di espressione dei miRNA biomarcatori per diversi tipi di malattie tra cui i tumori, le malattie rare e la degenerazione tissutale.

La deregolazione dei miRNA ha funzioni oncogeniche o soppressive del tumore praticamente in tutte le forme di cancro, incluso il neuroblastoma.

Ne è un esempio LIN28B, che è in grado di promuovere la tumorigenesi del neuroblastoma inibendo l'espressione dei microRNA della famiglia Let-7, e, quindi, la loro attività onco-soppressiva.

Lo sviluppo del neuroblastoma dipende dall'espressione di geni quali p53, Bcl2, SOX9 etc. e dal ruolo chiave che i miRNA svolgono nella loro espressione. I miRNA meglio studiati che presentano una specificità per il neuroblastoma sono miR-17-92 e miR-21, direttamente implicati nella tumorigenesi, nello sviluppo di metastasi e nella regolazione della differenziazione cellulare.(26)

I miRNA possono essere sottoposti a screening e utilizzati come potenziali biomarcatori del tumore. Per questo motivo lo studio dei miRNA è un ambito di grande interesse, soprattutto per la possibilità di valutarne l'espressione attraverso le biopsie liquide: un semplice prelievo di sangue fornisce in questo modo il materiale per monitorare la malattia in tempo reale e in maniera non invasiva.



## 2. Scopo del lavoro

Una delle principali caratteristiche del neuroblastoma è rappresentata dall'eterogeneità clinica e biologica. In alcuni bambini il tumore regredisce completamente o si differenzia spontaneamente senza trattamento, mentre in altri bambini si ha diffusione locale e metastatica con scarsi risultati della terapia e caratteristiche molecolari molto variabili.

Questo rende l'approccio terapeutico complesso e, in molti casi, inefficace. Infatti, circa il 50% dei pazienti con un tumore ad alto rischio manifesta una malattia refrattaria al trattamento o recidivante che porta a una prognosi infausta. (1)

È quindi importante trovare nuovi marcatori prognostici e target terapeutici per sviluppare il trattamento più idoneo per ciascun paziente.

La ricerca in ambito clinico e di laboratorio ha permesso una maggiore comprensione della biologia del neuroblastoma, ma soprattutto una stratificazione del rischio e l'identificazione di fattori prognostici per lo sviluppo di terapie sempre più efficaci da utilizzare nei sottogruppi di pazienti appropriati.

I fattori prognostici identificati includono fattori clinici, come l'età del paziente alla diagnosi, lo stadio del tumore, fattori biologici del tumore stesso, come la presenza o l'assenza di amplificazione dell'oncogene MYCN, le mutazioni di ALK, le alterazioni cromosomiche segmentali, come la delezione 11q, ma anche markers tumorali presenti nei liquidi biologici, tra cui i microRNA.

I microRNA si possono trovare all'interno di microvescicole extracellulari dal diametro variabile tra i 30 e i 120 nm, chiamate esosomi, rilasciate dalle cellule tumorali. Gli esosomi sono costituiti da una membrana cellulare lipidica e contengono materiale eterogeneo come DNA, RNA, inclusi i miRNA e proteine. (1)

Gli esosomi riflettono le caratteristiche delle cellule da cui vengono prodotti, quindi costituiscono dei tessuti surrogati che si possono isolare dai fluidi biologici (biopsie liquide) e analizzare per la presenza di alterazioni nell'espressione dei microRNA, corrispondenti a quelle riscontrate nei tessuti patologici da cui derivano.

I miRNA circolanti nei fluidi possono modulare selettivamente l'espressione di oncogeni in grado di indurre metastasi in organi distanti regolando il microambiente tumorale. (27) Gli effetti della regolazione dell'espressione genica mediata dai miRNA si traducono in una rilevanza clinica per la prognosi e il trattamento terapeutico.

La chemioterapia di induzione di prima linea è essenziale per diminuire la massa tumorale prima dell'intervento chirurgico necessario per impostare un corretto trattamento di mantenimento, ciò nonostante mancano dei parametri biologici che permettano di ottenere una previsione della risposta alla terapia.

Questo ha dunque portato ad interessarsi sempre più alle biopsie liquide, in quanto minimamente invasive, rapide e a basso costo, come fonti di possibili biomarcatori che potrebbero consentire di studiare l'evoluzione dinamica del profilo molecolare tumorale, la sua eterogeneità e i possibili meccanismi di resistenza.

Le biopsie liquide consentono inoltre di valutare la discrepanza delle diverse lesioni metastatiche e gli effetti causati dallo stress terapeutico sulle cellule tumorali, ma soprattutto di monitorare l'evoluzione clonale per comprendere meglio i meccanismi di refrattarietà. (1)

I miRNA contenuti negli esosomi presenti nel sangue di pazienti affetti da neuroblastoma ad alto rischio possono essere utili per identificare nuovi biomarcatori molecolari in grado di predire la risposta al trattamento chemioterapico, la tollerabilità, ma soprattutto la suscettibilità o la resistenza ai singoli farmaci in modo da consentire un approccio terapeutico più efficace.

Studi recenti hanno determinato che il profilo di espressione dei miRNA negli esosomi del plasma di bambini con neuroblastoma ad alto rischio può discriminare tra pazienti con buona o cattiva risposta alla chemioterapia d'induzione. (1)

Negli ultimi vent'anni, oltre alla FISH, sono state ottimizzate nuove tecniche quali l'ibridazione genomica comparativa (CGH), che permette di analizzare l'intero genoma del tumore e di identificare le aberrazioni numeriche e/o strutturali dei cromosomi.

L'ibridazione genomica comparativa su microarray (Array-CGH) è una tecnica di citogenetica molecolare dotata di alto potere risolutivo, che consente di identificare anomalie cromosomiche numeriche a carico sia dei cromosomi autosomici che sessuali, ovvero aneuploidie, ma anche variazioni del numero di copie (CNV) del DNA da analizzare, quali duplicazioni, amplificazioni, delezioni di dimensioni anche molto inferiori al limite di risoluzione della citogenetica convenzionale, rispetto ad un campione di DNA di riferimento.

Questa metodica mostra dati promettenti nella ricerca sul cancro e nella diagnosi, classificazione, prognosi di diverse neoplasie, oltre che per lo sviluppo degli obiettivi diagnostici e terapeutici.

L'utilizzo della tecnica array-CGH è principalmente diretto a rilevare anomalie genomiche e aberrazioni che causano malattie genetiche, tuttavia è adatto anche nello studio delle alterazioni e riarrangiamenti che si verificano di frequente a livello delle cellule tumorali per cui una diagnosi precoce può essere di beneficio per il paziente, dal momento che trattamenti e consulenze appropriati possono migliorare la prognosi.

La tecnica array-CGH costituisce un approccio altamente efficiente e discriminatorio per l'analisi dei tumori caratterizzati da cambiamenti genetici quantitativi, come nel caso del neuroblastoma, trovando campo sia nella localizzazione di importanti geni coinvolti nello sviluppo neoplastico, sia nel processo diagnostico, nella classificazione e nella prognosi ma anche nel monitoraggio della progressione tumorale.

L'obiettivo di questo lavoro è stato di cercare una correlazione tra le alterazioni cromosomiche e genomiche individuate con l'analisi array-CGH su biopsie del tumore e la modulazione del profilo di espressione dei miRNA esosomiali di pazienti con neuroblastoma ad alto rischio prima e dopo chemioterapia di induzione.

A questo scopo abbiamo utilizzato una piattaforma, XTENS 2.0 che raccoglie le informazioni cliniche e biologiche/molecolari di pazienti affetti da NB centralizzati presso l'Istituto G. Gaslini. Interrogando questa piattaforma abbiamo identificato 18 pazienti per i quali erano disponibili sia i dati di array-CGH, sia il profilo di espressione dei miRNA esosomiali. I risultati ottenuti da questa analisi permettono di avere delle informazioni prognostiche e di discriminazione tra pazienti ad alto rischio. Nonostante il basso numero di pazienti considerato, i risultati preliminari ottenuti da questo studio rappresentano un esempio dell'importanza dell'integrazione di dati biologici e clinici e potrebbero essere strumentali per l'identificazione di nuovi marcatori per potenziali nuovi trattamenti terapeutici. L'analisi ha lo scopo di dare indicazioni sull'aspetto prognostico, nonché di identificare potenziali applicazioni nel monitoraggio e nella terapia del neuroblastoma ad alto rischio.

## 3. Materiali e metodi

### 3.1. Campione

Il campione clinico dello studio è composto da pazienti affetti da neuroblastoma ad alto rischio indipendentemente da età, sesso e sintomatologia. Sono stati presi in considerazione:

- bambini affetti da tumori classificati con stadio 4
- bambini affetti da tumori classificati con stadio 3 con MYCN amplificato

Di questi pazienti sono stati selezionati solo coloro che avevano materiale biotico idoneo all'esordio della malattia (cellularità tumorale maggiore o uguale al 60%) da cui è stato estratto DNA qualitativamente e quantitativamente adeguato su cui eseguire l'analisi array-CGH. Per i medesimi pazienti erano disponibili anche prelievi di sangue da cui estrarre i miRNA esosomiali ottenuti sia prima che dopo la chemioterapia.

Il campione clinico è risultato così composto da 18 pazienti.

## 3.2. Purificazione dei microRNA esosomiali

Gli esosomi e i microRNA esosomiali sono stati isolati dal sangue con l'exoRNeasy Siero/Plasma Midi Kit (QIAGEN). In breve, 500 microlitri di plasma sono stati centrifugati per eliminare i detriti cellulari, i supernatanti sono stati miscelati con un volume di tampone XBP che consente il legame delle microvescicole sul filtro della colonna su cui viene caricato il campione. Viene eseguito un lavaggio e successivamente viene aggiunto un reagente di lisi sulla colonna in modo da consentire l'eluizione del contenuto degli esosomi trattenuti sul filtro. Viene quindi effettuata la purificazione dei miRNA. La qualità e la quantità del materiale estratto sono stati determinati con lo strumento Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent technologies).

La purificazione e la valutazione qualitativa dei microRNA esosomiali sono effettuate dalla sezione Genomica della Biobanca Integrata Tessuto-Genomica (BIT) dell'Istituto Giannina Gaslini, dove il campione viene registrato con un apposito codice identificativo.

### 3.2.1. Analisi dell'espressione dei miRNA

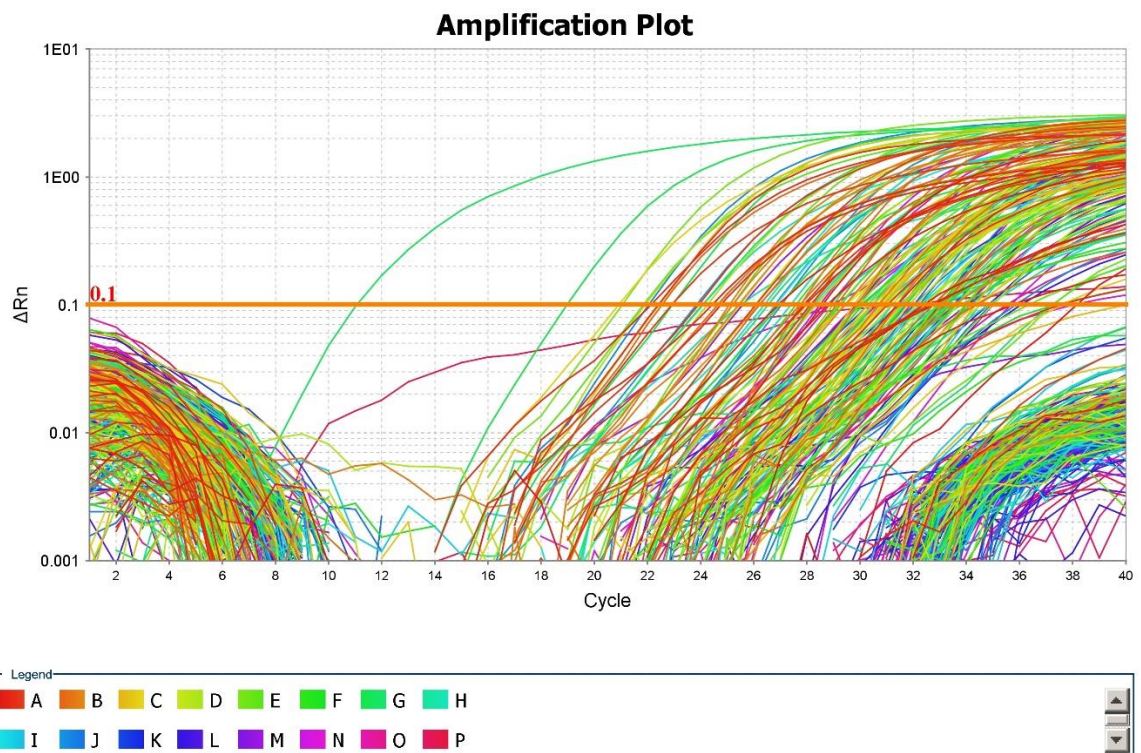
Il profilo di espressione miRNA esosomiali è stato valutato mediante Real-Time quantitativa (RTqPCR) con la TaqMan Human microRNA Array Card Technology (Thermo Fisher Scientific), un array che consente di analizzare 384 microRNA per ogni campione.

In breve, 50 ng di RNA sono stati retrotrascritti con il kit di retrotrascrizione specifico per i microRNA (Thermo Fisher Scientific). Vista la poca disponibilità di materiale, l'RNA retrotrascritto è stato ulteriormente preamplificato prima di procedere con la RTqPCR.

Per l'allestimento della TaqMan Human microRNA Array Card, 9  $\mu$ L di campione sono stati miscelati con la TaqMan Universal Master mix (Thermo Fisher Scientific) e caricati nei relativi pozzetti.

La card è stata corsa sul sistema di Real Time quantitativa ViiA7 (Thermo Fisher Scientific).

Nella figura 4 sono rappresentate le curve di amplificazione di ciascuna RTqPCR.



**Figura 4. Curve di amplificazione della RTqPCR.** Per ogni campione si ottengono curve di amplificazione relative a ogni microRNA analizzato. Ogni curva è caratterizzata da una fase di crescita esponenziale, seguita da una fase di plateau.

### 3.3. Array-CGH: ibridazione genomica comparativa (CGH)

Per l'identificazione di anomalie nel numero di cromosomi e di aberrazioni cromosomiche strutturali (amplificazioni e delezioni) è stata utilizzata la tecnica Array-CGH sul DNA estratto da tessuto tumorale NB all'esordio.

#### **Prelievo campione**

Il tessuto da analizzare viene estratto da materiale neoplastico ottenuto mediante biopsia chirurgica e per essere ritenuto idoneo il contenuto di cellule tumorali deve risultare almeno del 60%. (28)

In seguito all'accettazione del materiale si procede con l'estrazione del campione di DNA tumorale con il kit di purificazione del DNA MasterPure (Epicenter) secondo il protocollo del produttore. Così come per i microRNA esosomiali, anche l'estrazione di DNA viene eseguita dalla sezione Genomica della Biobanca BIT Gaslini.

#### **Quantificazione e valutazione della qualità del DNA**

La purezza e la quantità del campione di DNA vengono valutate allo spettrofotometro.

La purezza e la quantità del campione di DNA vengono valutate con lo spettrofotometro. Il DNA, al fine di essere utilizzato per l'array-CGH, deve avere rapporti di purezza adeguati. In particolare, il rapporto 260/280, indice di contaminazione proteica, non deve essere inferiore a 1.8 o superiore a 2.2, mentre il rapporto 260/230, indice della contaminazione da fenoli, deve essere compreso nell'intervallo 1.6-2.2. Inoltre, la concentrazione del DNA non deve essere inferiore a 30 µg/µl. (29)

Viene utilizzato il DNA del soggetto in analisi (DNA test) e un quantitativo identico di DNA di riferimento (DNA reference) di un individuo dello stesso sesso. Entrambi vengono messi in incubazione con enzimi di restrizione e successivamente marcati con due fluorocromi di colore diverso: con il verde il DNA test e con il rosso il DNA reference.

I due DNA marcati vengono letti allo Spettrofotometro per registrare il valore della concentrazione del fluorocromo, cioè l'efficienza della marcatura.

## **Ibridazione con i microarray**

I DNA vengono ibridati al vetrino con gli oligonucleotidi per un'intera notte a 65°C e in seguito il vetrino contenente gli array viene letto utilizzando Agilent Scanner.

Si misura l'intensità di fluorescenza emessa dai DNA ibridati sull'array e si compara tra i diversi DNA. In questo modo è possibile evidenziare le alterazioni cromosomiche e genomiche nel DNA test.

### **3.3.1. Analisi dei dati**

I dati ottenuti dalla lettura del vetrino vengono salvati con riferimenti al giorno e all'anno in cui è stata eseguita l'analisi. Vengono poi interpretati dal citogenetista mediante l'uso di software Agilent.

L'analisi di tutto il genoma mediante array-CGH viene eseguita utilizzando la piattaforma 180K, con risoluzione media di circa 25 Kb ed è effettuata usando come controllo il DNA reference. (30)

Una variazione del numero di copie (CNV) è definita come un tipo di variante strutturale che comporta alterazioni del numero di copie di specifiche regioni del DNA che possono essere eliminate o duplicate.

Per quanto riguarda i limiti della tecnica, questa non è in grado di evidenziare: mosaicismi  $\leq 20\%$ , riarrangiamenti cromosomici bilanciati, riarrangiamenti cromosomici sbilanciati delle regioni pseudoautosomiche dei cromosomi X e Y ed infine riarrangiamenti sbilanciati delle regioni pericentromeriche.

È importante come nel risultato non siano considerate patologiche le delezioni e/o le duplicazioni riportate come varianti genomiche nel "Database of Genomic Variants". (28)

Infine, il referto dell'analisi dei dati viene generato in formato PDF con le variazioni del genoma tumorale, quali delezioni, duplicazioni etc. e con i dati anagrafici del paziente.

I requisiti e le procedure utilizzate per la compilazione del referto e l'archiviazione dei dati sono conformi alle Linee Guida erogate dalla Società Italiana di Genetica (SIGU).

Il tempo massimo per ottenere l'analisi genetica è di circa sei settimane dal giorno del ricovero del paziente nel quale viene richiesto un consenso informato per gli accertamenti genetici.



### 3.4. Dati clinici

I dati clinici riguardanti i 18 pazienti in studio sono stati forniti dal reparto di Oncologia pediatrica dell'Istituto Giannina Gaslini.

I dati che abbiamo utilizzato e a cui abbiamo fatto riferimento per l'analisi statistica sono:

- Codice identificativo paziente
- Sesso
- Età in mesi
- Stadio malattia
- Sede malattia
- Istologia
- Età alla diagnosi
- Ultimo follow up
- Recidive
- Event-free survival
- Overall survival

### 3.5. Piattaforma XTENS2

I dati di laboratorio ottenuti dall'analisi dei livelli di espressione dei miRNA su biopsia liquida e dallo studio del materiale biotico mediante tecnica CGH-array sono stati inseriti, insieme ai dati clinici, nella piattaforma XTENS2, associata alla Biobanca BIT Gaslini.

XTENS 2 è una piattaforma web sviluppata in collaborazione tra il Laboratorio di Biologia Molecolare dell'Istituto Giannina Gaslini e il Dipartimento DIBRIS dell'Università di Genova e permette di strutturare, integrare, interrogare e condividere dati eterogenei in campo biomedicale. Il sistema è provvisto di uno strumento di interrogazione per effettuare ricerche avanzate su un insieme di dati eterogenei utilizzando un'interfaccia grafica. Possono essere effettuati due tipi di interrogazioni:

- interrogazioni eseguite su un singolo dato
- interrogazioni su caratteristiche tra più dati parallelamente

L'interfaccia grafica è stata ideata con l'obiettivo di essere semplice e intuitiva.

Quando l'utente entra nella piattaforma appaiono solo due caselle con limitate opzioni: la prima, denominata "*Search for*", contiene la lista di tutti i dati ai quali l'utente può accedere, la seconda, denominata invece "*Matching*", contiene due opzioni: "*All conditions*" e "*Any of the conditions*".

Per ogni dato possono essere eseguite condizioni di filtraggio aggiuntive attraverso il campo "*Add field*" e, se è numerico, possono essere applicate le operazioni standard di comparazione (>, =, < etc...).

Sono stati inseriti nella piattaforma diversi tipi di dati:

- dati clinici: età, sesso, sede del tumore primario, stadio, età alla diagnosi, recidiva, follow up
- profilo di espressione dei miRNA esosomiali
- profilo genomico (alterazioni cromosomiche e dei rispettivi geni)

Attraverso l'utilizzo della piattaforma XTENS2 è possibile quindi vedere in modo grafico ogni singolo paziente con associati i dati sopracitati e selezionarli per studiarne il singolo.

### Query Builder

My Queries Select a query 🗑️ 📄

Search for:	Patient	Matching:	All Conditions	<span>Add Field</span> <span>Add Nested Condition</span> <span>Multi Project</span> <span>✕</span>
Subject Code	=		Sex	=
Field Name	Please Select			<span>+</span>
Search for:	aCGH - Raw	Matching:	All Conditions	<span>Add Field</span> <span>Add Nested Condition</span> <span>Get Metadata</span> <span>✕</span>
Field Name	Please Select			<span>+</span>
Search for:	aCGH - Processed	Matching:	All Conditions	<span>Add Field</span> <span>Add Nested Condition</span> <span>Get Metadata</span> <span>✕</span>
Field Name	Please Select			<span>+</span>
Search for:	CNV	Matching:	All Conditions	<span>Add Field</span> <span>Get Metadata</span>
Field Name	Please Select			<span>+</span>
Search for:	NB Clinical Information	Matching:	All Conditions	<span>Add Field</span> <span>Get Metadata</span>
Field Name	Please Select			<span>+</span>

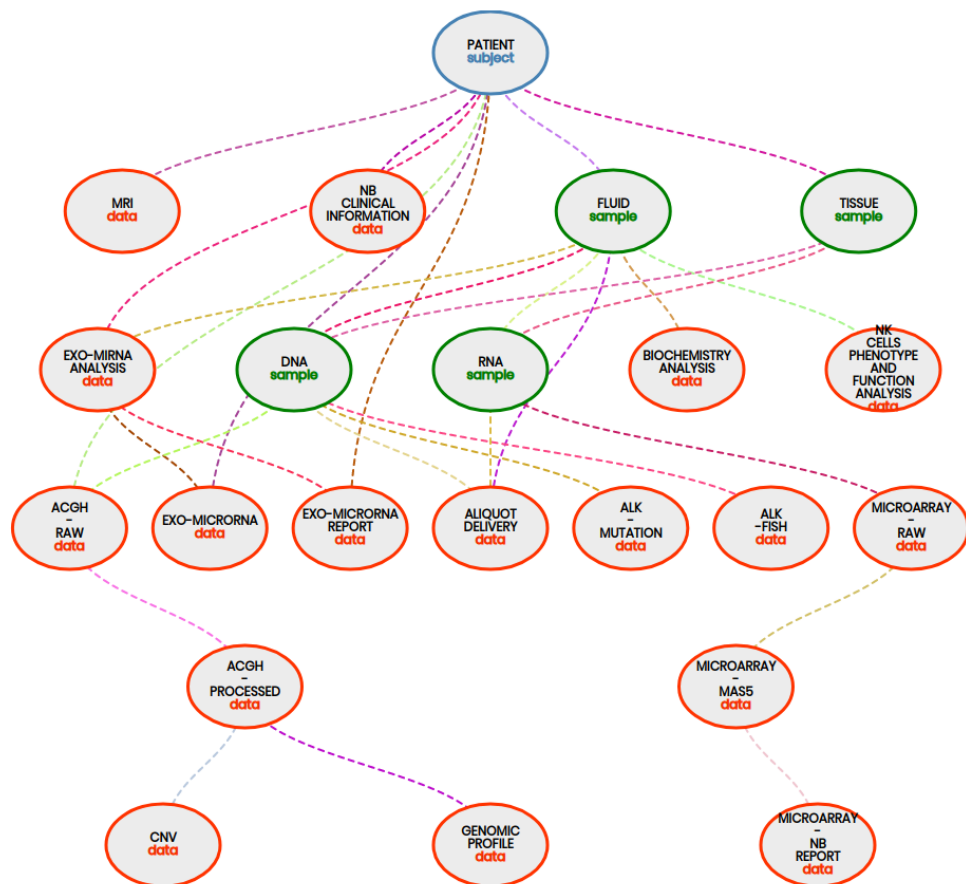
Search Reset

**Figura 5. Interrogazione eseguita su caratteristiche tra più pazienti**

### Data Type Graph

Select a DataType:

Patient Generate Graph



**Figura 6. Grafico di interrogazione eseguita su singolo paziente**

### 3.6. Analisi bioinformatica

L'analisi statistica dei dati raccolti è stata rappresentata utilizzando alberi decisionali (decision tree). Si tratta di una delle tecniche di classificazione più popolari in quanto gli alberi decisionali sono in grado di rappresentare i risultati in un formato semplice e di facile interpretazione, poichè si può identificare la struttura di decisione nel processo di classificazione.

Il formato dell'albero decisionale si basa sulle foglie, rappresentate con un valore specifico per l'attributo vivo o morto, e i nodi interni, che rappresentano attributi descrittivi, ovvero biomarcatori. Seguendo un percorso che va dalla radice a una foglia, è facile estrarre le regole di classificazione che possono essere espresse in linguaggio comune in modo da facilitare notevolmente la conversione dei risultati in applicazioni cliniche. Infatti, i risultati vengono classificati sotto forma di foglie che possono essere trasformate in regole esplicite.

Per la stratificazione dei pazienti abbiamo utilizzato l'algoritmo dell'albero decisionale J48 implementato nello strumento software WAikato Environment for Knowledge Analysis (WEKA), mentre, per aumentare il numero di alberi decisionali validi generati dall'algoritmo, è stato utilizzato il modulo RandomSubSpace implementato in WEKA.

Il sistema seleziona casualmente marcatori tra quelli forniti dall'utente per poter creare un nuovo albero decisionale ad ogni interazione: per costruire i classificatori degli alberi decisionali, per ciascun paziente affetto da neuroblastoma ad alto rischio è stato utilizzato il profilo di espressione dei miRNA esosomiali e l'aberrazione cromosomica raggruppata per cromosoma e studiata mediante CGH.

I criteri per la selezione di alberi decisionali validi includono:

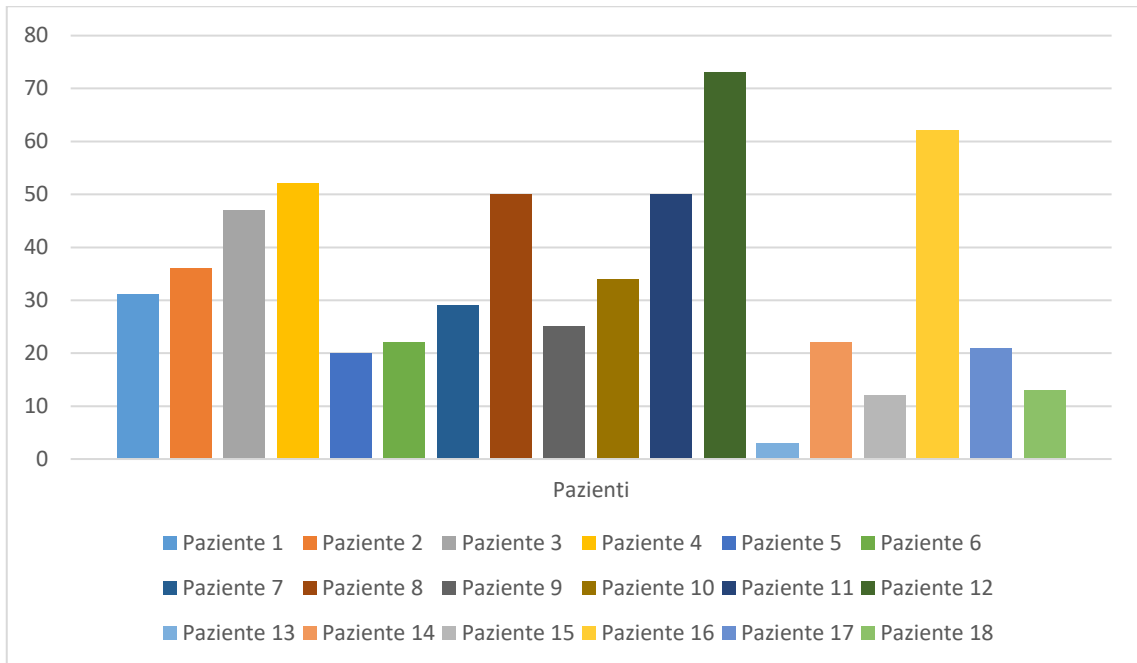
- 0% di errore associato a ogni regola
- Almeno due pazienti che soddisfano una regola
- Almeno un miRNA esosomiale e un'aberrazione cromosomica devono essere inclusi nella regola.

## 4. Risultati

### 4.1. Caratteristiche della popolazione

La nostra coorte di studio è composta da 18 pazienti, 10 maschi e 8 femmine con età alla diagnosi compresa tra 3 mesi e 6 anni, affetti da neuroblastoma ad alto rischio, 16 con stadio M secondo la classificazione *INGRSS* e 2 con stadio L2 MYCN amplificati.

L'età alla diagnosi è rappresentata nel grafico sottostante:



**Figura 7. Età alla diagnosi dei 18 pazienti in mesi**

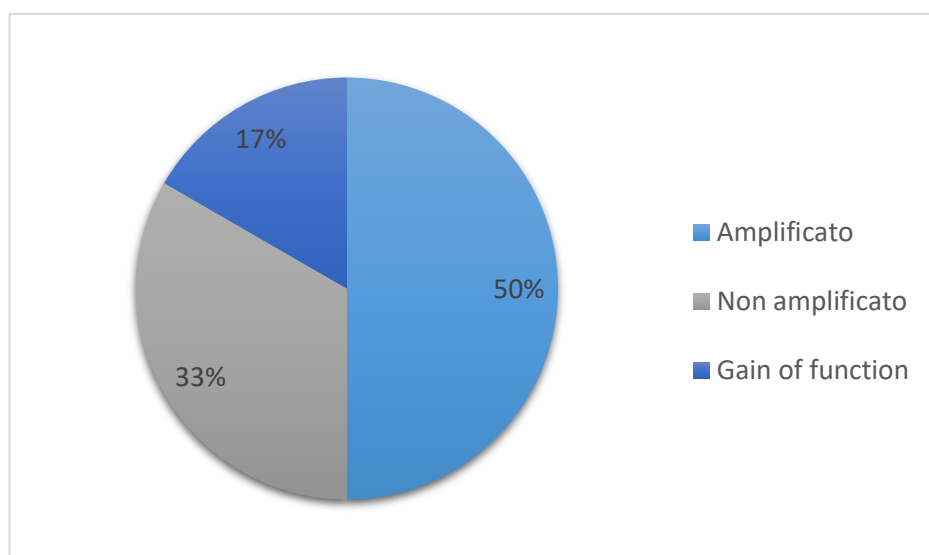
Come si può notare dal grafico, i pazienti hanno tutti un'età alla diagnosi al di sotto dei 5 anni eccetto per due pazienti di età 6 anni e un mese e 5 anni e due mesi.

Dei 18 pazienti, 10 hanno avuto una recidiva e di questi, 5 all'ultimo follow up risultano deceduti.

I deceduti totali sulla coorte di 18 pazienti sono 6.

<b>Tabella 5. Dati pazienti</b>	
<b>Sesso</b>	
Maschi	10
Femmine	8
<b>INRGSS</b>	
M	16
L2	2
<b>Recidiva</b>	
Si	10
No	8
<b>Stato ultimo follow-up</b>	
Deceduti	6
Vivi	12

Un dato clinico molto importante da tenere in considerazione nell'analisi dei dati è sicuramente lo stato di MYCN. Come è possibile vedere nel grafico sottostante, il 50% dei pazienti ha un MYCN amplificato, mentre non vi è alcuna alterazione nel 33%.



**Figura 8. Stato MYCN dei 18 pazienti**

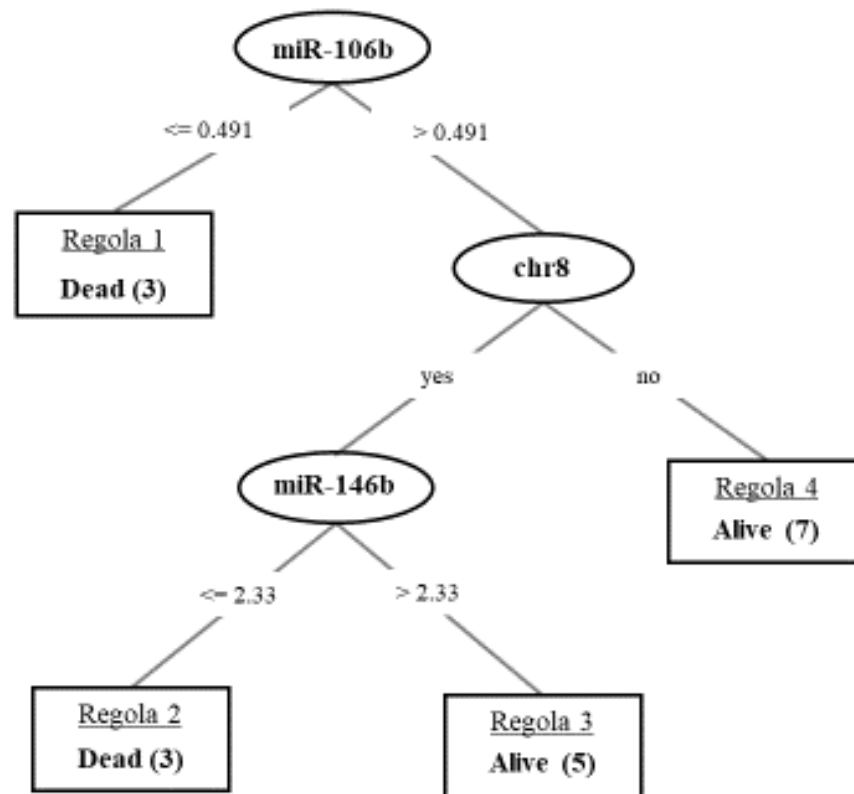
Gli aspetti prettamente clinici in merito alla localizzazione primaria, all'istologia del tumore nonché allo stadio secondo il sistema di classificazione *INSS* dei pazienti in studio sono rappresentati nella tabella sottostante.

<b>Tabella 6. Dati clinici pazienti</b>			
	<b>Sede tumore primitivo</b>	<b>Istologia</b>	<b>Stadio secondo <i>INSS</i></b>
<b>Paziente 1</b>	Surrene	N.O. S*	4
<b>Paziente 2</b>	Surrene	Poco differenziato	4
<b>Paziente 3</b>	Surrene	Poco differenziato	4
<b>Paziente 4</b>	Surrene	Poco differenziato	4
<b>Paziente 5</b>	Surrene	Indifferenziato	3
<b>Paziente 6</b>	Surrene	N.D.°	4
<b>Paziente 7</b>	Gangli retroperitoneali	Poco differenziato	4
<b>Paziente 8</b>	Gangli retroperitoneali	Poco differenziato	4
<b>Paziente 9</b>	Pelvi	Poco differenziato	4
<b>Paziente 10</b>	Gangli retroperitoneali	Poco differenziato	3
<b>Paziente 11</b>	Gangli retroperitoneali	Poco differenziato	4
<b>Paziente 12</b>	Surrene	N.O.S	4
<b>Paziente 13</b>	Gangli retroperitoneali	Poco differenziato	4
<b>Paziente 14</b>	Gangli retroperitoneali	N.D.	4
<b>Paziente 15</b>	Gangli retroperitoneali	Poco differenziato	4
<b>Paziente 16</b>	Gangli retroperitoneali	Poco differenziato	4
<b>Paziente 17</b>	Surrene	Poco differenziato	4
<b>Paziente 18</b>	Gangli toraco-addominali	Poco differenziato	4

\* Neuroblastoma non definibile a causa della scarsa qualità delle sezioni, di estese aree emorragiche, necrotiche o artefatti tecnici.  
°Non disponibile

## 4.2. Analisi dell'outcome

Dall'analisi dei diversi marcatori presi in studio, ovvero l'espressione dei livelli di miRNA e le alterazioni cromosomiche identificate mediante CGH array, si è potuto arrivare alla definizione di "Regole" perfettamente applicabili alla coorte dei 18 pazienti.



**Figura 9. Albero decisionale dell'outcome.** Nelle figure ovali o nodi vengono indicati i biomarcatori, mentre all'interno dei rettangoli viene definita la regola con il numero di pazienti che soddisfano tale regola

Come si può vedere dalla *Figura 9*, i biomarcatori sono rappresentati all'interno di nodi, (figure ovali) mentre le regole all'interno di rettangoli nei quali viene indicato l'evento (morte o sopravvivenza), ma anche il numero di pazienti che soddisfano le singole regole.

Per quanto riguarda l'outcome, l'analisi bioinformatica ha evidenziato che l'espressione del miRNA-106b ha un ruolo nella sopravvivenza. Il cut-off del livello di espressione è 0,491: un valore di espressione inferiore o uguale a 0,491 è associato all'evento morte, per un totale di 3 pazienti su 18. (Regola 1).



Analizzando questi tre pazienti si può notare che hanno tutti hanno un'età alla diagnosi inferiore ai 4 anni, con uno stadio di malattia M secondo il sistema di classificazione *INRGSS*. Due su tre hanno MYCN amplificato con recidiva entro i primi due anni.

Quando il livello di espressione di miR-106 è maggiore di 0,491, l'outcome dei pazienti varia in base allo stato del cromosoma 8: se non vi sono alterazioni quali delezioni o amplificazioni, i pazienti sono vivi. (Regola 4).

I 7 pazienti con tali marcatori hanno caratteristiche cliniche diverse gli uni dagli altri, (istologia, sede del tumore primario, amplificazione MYCN, età alla diagnosi etc...) ma un aspetto da evidenziare è che i due pazienti con stadio L2 della corte in studio rientrano in questa regola, nonostante l'amplificazione di MYCN. Quando invece vi sono alterazioni a livello del cromosoma 8 (principalmente delezioni), l'outcome dei restanti pazienti dipende dal livello di espressione di miRNA 146b:

- Se è minore o uguale a 2.33 i pazienti sono deceduti (Regola 2)
- Se è maggiore di 2.33 i pazienti sono vivi (Regola 3)

Analizzando nel particolare i tre pazienti deceduti con le caratteristiche sopra indicate, è possibile notare che tutti hanno una malattia con stadio M, un'età alla diagnosi inferiore ai 5 anni e una localizzazione primitiva della neoplasia a livello surrenale.

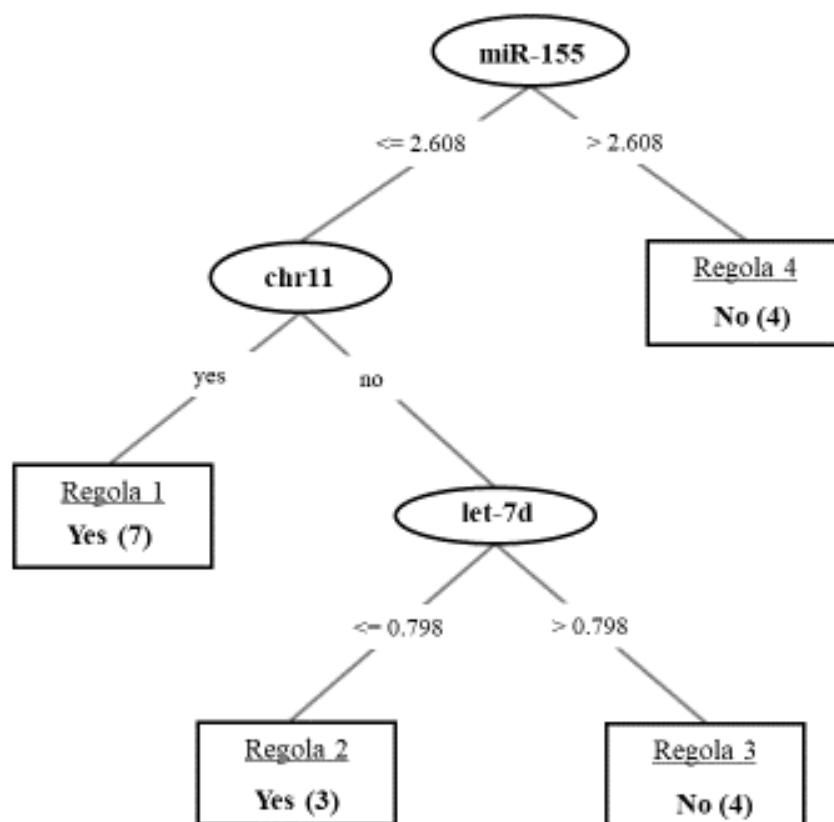
MYCN è amplificato in due pazienti mentre nel terzo ha un guadagno di funzione.

Tutti e tre i pazienti sono andati incontro a una recidiva. Invece, per quanto riguarda i cinque pazienti vivi, non vi sono particolari correlazioni rilevanti.

### 4.3. Analisi dell'evento recidiva

Anche in questo caso i biomarcatori sono rappresentati dai nodi, ovvero figure ovali, come è possibile vedere nella *Figura 10*.

Nei rettangoli invece sono contenute le seguenti informazioni (dall'alto verso il basso): numero identificatore della regola, “Sì o No” riferito al verificarsi dell'evento recidiva e infine il numero di pazienti che soddisfano le condizioni della regola.



**Figura 10. Analisi dell'evento recidiva.** Nelle figure ovali o nodi vengono indicati i biomarcatori, mentre all'interno dei rettangoli viene definita la regola con il numero di pazienti che soddisfano tale regola

Attraverso l'analisi bioinformatica sono stati identificati alcuni biomarcatori che sembrano predire nella coorte in studio il verificarsi dell'evento recidiva.

Il primo di questi è miRNA-155: quando il suo valore di espressione è maggiore di 2,608 non si verifica l'evento recidiva. (Regola 4)

Sono quattro i pazienti che soddisfano il criterio appena citato, con stadio di malattia M e tumore con cellule scarsamente differenziate. Lo stato di MYCN varia: due pazienti hanno MYCN amplificato, uno ha un guadagno di funzione ed infine l'ultimo non ha amplificazione.

Quando invece il valore di espressione di miRNA-155 è inferiore o uguale a 2,608, la possibilità che si verifichi l'evento recidiva dipende dalla presenza di alterazioni del cromosoma 11. In 7 pazienti sono presenti amplificazioni/delezioni del cromosoma 11 e dal punto di vista clinico questi pazienti hanno avuto una recidiva di malattia entro i primi 3 anni dalla diagnosi (Regola 1). Sono pazienti con stadio iniziale M, MYCN amplificato in un bambino, MYCN non amplificato in quattro bambini ed infine MYCN con guadagno di funzione nei restanti due.

Nei bambini con assenza di alterazioni a carico del cromosoma 11, la recidiva di malattia dipende dal valore di espressione del miRNA let-7d:

- Se è maggiore di 0,798 il paziente non ha una ricaduta (Regola 3)
- Se è minore o uguale a 0,798 il paziente ha una ricaduta (Regola 2)

I quattro pazienti nei quali non si è verificato l'evento hanno risposto parzialmente alla terapia di prima linea nel 50% dei casi mentre nel restante 50% hanno risposto completamente. Tre pazienti su quattro hanno MYCN amplificato.

È interessante notare come anche in questa analisi i due pazienti con stadio di malattia L2 rientrino in una categoria con prognosi migliore, ovvero assenza di recidiva.

Invece, tra i tre pazienti con ricaduta è importante notare che nessuno di questi ha risposto alla terapia di prima linea, ma piuttosto sono tutti andati in progressione di malattia. Sono pazienti con stadio M, MYCN amplificati ma soprattutto hanno la particolarità di avere una età alla diagnosi di 21,22 e 22 mesi, ovvero bassa sotto i due anni.

Analizzando anche l'*event-free survival* (sopravvivenza libera da eventi), è importante notare che la recidiva è avvenuta intorno all'anno dalla diagnosi, quindi un periodo di tempo molto breve.

## 5. Discussione

In questa tesi sono stati riportati i dati relativi allo studio della relazione tra le alterazioni cromosomiche e genomiche individuate con l'analisi mediante array-CGH su biopsie di tumore e l'espressione del profilo di miRNA esosomiali ottenuti da biopsie liquide di pazienti con neuroblastoma ad alto rischio prima e dopo chemioterapia di induzione.

L'obiettivo è stato quello di cercare dei biomarcatori predittivi dell'andamento dei pazienti e della risposta alla terapia.

È ormai noto che, nonostante la maggior parte dei miRNA si trovi nelle cellule, un numero significativo di queste molecole è presente in sede extracellulare in vari fluidi corporei ed è implicato nella regolazione delle cellule staminali tumorali, rappresentando quindi una risorsa valida di biomarcatori in vari tumori.

L'evidente necessità di nuovi strumenti molecolari diagnostici in ambito oncologico ha recentemente portato a un interesse sempre maggiore per le biopsie liquide come fonte di biomarcatori, in quanto rappresentano un metodo minimamente invasivo, con costi inferiori rispetto alle tecniche tradizionali. (1)

Pertanto, riconoscere la potenziale utilità dei miRNA circolanti nel plasma nella diagnosi di neuroblastoma ad alto rischio ha un'importanza fondamentale per lo sviluppo di una cura migliore, ma soprattutto può permettere l'identificazione di biomarcatori in grado di predire l'andamento della malattia.

L'aspetto su cui si è concentrato maggiormente il nostro studio è stato quello di valutare l'andamento dei pazienti in rapporto ad alterazioni cromosomiche e ai profili di espressione di miRNA, in modo tale da poter identificare possibili biomarcatori prognostici e di risposta alla terapia.

Dai risultati dell'analisi è possibile comprendere come vi siano alcuni miRNA il cui profilo di espressione, associato ad amplificazioni o delezioni di cromosomi, sia in grado di predire una prognosi nettamente infausta.

## 5.1. Biomarcatori di sopravvivenza

Dall'analisi della sopravvivenza della coorte considerata di 18 pazienti è emerso che vi sono due miRNA, miR-106b e miR-146b associati a una prognosi peggiore quando i livelli di espressione sono bassi, rispettivamente  $\leq 0,491$  e  $\leq 2,33$ . Ciò suggerisce quindi che entrambi svolgano un ruolo di regolazione a livello tumorale.

Abbiamo osservato che un valore di espressione di miRNA 106b è inferiore o uguale a 0,491 era associato alla morte dei pazienti.

Il miRNA 106 è stato coinvolto in processi di trasformazione cellulare e metastatizzazione ma anche nella downregolazione di geni oncosoppressori come il CHD5. (31)

Il MiR-106b può essere espresso in modo aberrante in tumori solidi umani, cioè avere paradossalmente funzioni opposte nell'oncogenesi, cioè come oncomiR o tumor suppressor.

Secondo alcuni studi la diminuzione di espressione di miR-106b nel tumore del colon-retto ha indotto la transizione epiteliale-mesenchimale, meccanismo che è alla base della metastatizzazione. Sembrerebbe dunque conferire proprietà migratorie e invasive alle cellule tumorali. (32)

Secondo altri recenti studi invece, la sovraespressione di miR-106b-5p può favorire la progressione aggressiva dell'epatocarcinoma, promuovendo la proliferazione e l'invasione delle cellule neoplastiche e inibendo l'apoptosi. FOG2 è stato identificato come target diretto di miR-106b-5p ed è coinvolto nella regolazione di molteplici processi fisiologici, come lo sviluppo vascolare, lo sviluppo cardiaco, la regolazione della segnalazione dell'insulina e del metabolismo lipidico. (33)

Quindi come già detto precedentemente lo stesso miRNA può avere funzioni opposte nell'oncogenesi, in quanto ogni miRNA può agire su più geni target e diversi miRNA possono regolare lo stesso gene. (34)

Per quanto riguarda, invece, il miRNA 146b, si è notato che nei pazienti esaminati con alterazioni a carico del cromosoma 18, quali amplificazioni o delezioni, un livello di espressione al di sotto di 2,33 è associato ad un esito infausto.

È stato dimostrato che il miR-146b è espresso in modo aberrante in numerosi tipi di tumore umani, nei quali svolge un ruolo cruciale nella carcinogenesi.

Come per il miR-106b, anche il miR-146b può avere funzioni opposte. Infatti, è stato trovato sovraespresso nel carcinoma papillare della tiroide, (35) e down regolato nel tumore della cervice uterina e nel carcinoma epatico. (33) (36)

Inoltre, si hanno evidenze sull'importanza di questo miRNA nel neuroblastoma, in quanto sembrerebbe avere un ruolo nel promuovere la crescita cellulare. (35)

## 5.2. Biomarcatori di ricaduta

Per quanto invece riguarda l'analisi dell'evento recidiva, nella coorte in studio di 18 pazienti sono stati identificati due possibili biomarcatori che trovano una grande evidenza nella letteratura: alterazioni a carico del cromosoma 11 e miRNA let-7d

L'amplificazione MYCN e la perdita allelica del braccio q del cromosoma 11 rappresentano i più importanti marcatori genetici del neuroblastoma ampiamente valutati in ambito clinico, essenziali per predire la prognosi ed eventuali recidive. (37)

L'amplificazione di MYCN è riscontrata in circa il 20% dei neuroblastomi mentre i riarrangiamenti nel cromosoma 11q si verificano in circa il 30% dei casi.

Entrambi sono associati a prognosi sfavorevole e per questo motivo sono stati recentemente definiti come fattori di rischio indipendenti nella classificazione INRG. (37)

È stato però descritto un rapporto inverso tra l'amplificazione di MYCN e la delezione 11q, ovvero le due alterazioni si escludono quasi a vicenda, il che indica distinti sottotipi genetici di neuroblastoma ad alto rischio, con caratteristiche distinte.

Tuttavia, indipendentemente dall'amplificazione del MYCN, i neuroblastomi con delezione in 11q mostrano un'alta frequenza di rotture cromosomiche che suggeriscono una elevata instabilità cromosomica. Questa elevata instabilità cromosomica sembra essere determinata da uno o più geni presenti sul segmento 11q, a causa di aploinsufficienza o inattivazione del secondo allele per mutazioni o fattori epigenetici. (38)

Dunque, una possibile spiegazione dell'associazione di 11q a scarsi risultati clinici e a cattiva prognosi è che questa regione possa contenere geni implicati nella riparazione del DNA o geni oncosoppressivi. (39)

Recenti studi affermano inoltre che in questa regione del cromosoma risiedono geni coinvolti nella differenziazione cellulare e responsabili del meccanismo patogenetico di insorgenza del neuroblastoma. (40)

Come precedentemente accennato, la perdita di 11q è nota per essere un'alterazione genetica ricorrente riscontrata più frequentemente nei neuroblastomi ad alto rischio ed è principalmente associata a prognosi sfavorevole, ma il modo in cui questa aberrazione cromosomica influisce sullo sviluppo della malattia rimane scarsamente definito.

Il momento preciso della delezione 11q non è ancora del tutto chiaro. La frequenza aumenta con lo stadio, essendo l'8% nello stadio 1 e il 52% nello stadio 4 e con l'età di insorgenza, suggerendo che questa alterazione rappresenti un evento di stadio avanzato. (38)

L'analisi CGH del ganglioneuroblastoma, un sottogruppo di tumore neuroblastico, non ha invece mostrato casi con delezione 11q, suggerendo che questo evento si verifichi raramente nei tumori meno aggressivi.

La delezione della regione 11q23 è l'alterazione cromosomica che si trova più frequentemente.

Questa delezione sembra essere coinvolta nella deregolazione di geni importanti, inclusi i geni soppressori del tumore e gli oncogeni quali Forkhead Box R1 (*FOXR1*), che si trova in posizione 11q23.3. (41)

Inoltre, in diversi studi, valutando lo stato allelico del cromosoma 11q, si è riscontrato una perdita di eterozigosi di 11q in circa il 34-44% dei campioni di neuroblastoma. (38)

Recentemente è stato scoperto che, per i pazienti con neuroblastoma metastatico con coinvolgimento del midollo osseo, la delezione 11q23 prevede una prognosi sfavorevole solo in quelli senza amplificazione *MYCN*. (41)

Infine, nel particolare sottogruppo di pazienti adolescenti e giovani adulti affetti da neuroblastoma, che rappresenta meno del 5% dei casi e che è caratterizzato da un'alta prevalenza di SCA, la perdita di 11q è compresa tra il 30 e il 60%. (38)

Per quanto riguarda l'approccio terapeutico, nonostante i progressi della terapia multimodale, i neuroblastomi con delezione nel cromosoma 11q vanno spesso incontro a più recidive consecutive con esito infausto.

Per questo motivo si sta cercando di identificare un bersaglio molecolare sfruttabile per una medicina di precisione come la poli ADP-ribosio polimerasi (PARP), che fa parte di una famiglia di proteine che svolge un ruolo importante nella riparazione del DNA. In questo sottotipo di pazienti l'utilizzo di farmaci inibitori di PARP, attualmente già usati per il trattamento del carcinoma ovarico e del tumore della mammella BRCA positivi, nel neuroblastoma sembrerebbe indurre la morte delle cellule tumorali con un miglioramento evidente della risposta al trattamento.



Nell'analisi dell'evento recidiva, in pazienti senza alterazioni a livello del cromosoma 11, è il miRNA *let-7-d* a determinare la presenza di una ricaduta. A conferma di quanto precedentemente detto, tutti i pazienti senza delezioni del cromosoma 11, salvo per un caso, hanno il *MYCN* amplificato.

*let-7* è una famiglia altamente conservata di microRNA implicati nella regolazione dello sviluppo embrionale e nel mantenimento dello stato di differenziazione dei tessuti. Sono tra i miRNA più abbondantemente espressi e, in quanto potenti soppressori tumorali, sono in grado di inibire lo sviluppo tumorale attraverso la repressione post-trascrizionale di molteplici bersagli oncogenici, tra cui *RAS* e *MYC*. (42)

Infatti, *Let-7* è downregolato in più tipi di tumore ed è stato per questo collegato all'oncogenesi.

È stato scoperto che bassi livelli di *let-7* sono comuni nel neuroblastoma, inversamente associati all'amplificazione di *MYCN* e indipendentemente associati a prognosi sfavorevole. (42)

I miRNA della famiglia *let-7* sono forti regolatori negativi di *MYCN* e inibiscono la proliferazione e la crescita delle cellule di neuroblastoma amplificate da *MYCN*. (43)

Infine, alcuni miRNA della famiglia *let-7* sono indirettamente down-regolati da LIM Domain Only 1 (*LMO1*), un gene di suscettibilità al neuroblastoma che codifica per un regolatore trascrizionale con attività pro-tumorale. (44)

Di conseguenza, è probabile che *LMO1* sia coinvolto nella regolazione dell'espressione di una varietà di geni necessari allo sviluppo del neuroblastoma in pazienti ad alto rischio.

Si pensa quindi che l'identificazione dei regolatori di *let-7* possa portare a definire nuove vie molecolari promotrici del tumore, così come nuove molecole terapeutiche. (44)

## 6. Conclusioni

Negli ultimi anni, sono stati fatti sostanziali progressi nel tentativo di comprendere i cambiamenti molecolari che portano a neuroblastomi più aggressivi nonché alterazioni in grado di predire l'evoluzione e la prognosi.

Uno dei principali obiettivi nella diagnosi e nella stadiazione del neuroblastoma è l'identificazione di caratteristiche molecolari che possano essere utilizzate come biomarcatori per permettere una migliore caratterizzazione del tumore.

L'individuazione di profili genetici di rischio individuale permetterebbe, inoltre, non solo una maggior comprensione della patologia ma anche un approccio terapeutico più mirato.

Servono quindi biomarcatori sensibili, specifici e rilevabili con metodi minimamente invasivi per permettere una diagnosi il più precisa possibile e per rilevare le caratteristiche più salienti per indirizzare i pazienti pediatrici al trattamento più idoneo.

Nella mia tesi ho valutato i profili di espressione dei miRNA, ottenuti mediante biopsie liquide, rapportati ad alterazioni cromosomiche delle cellule tumorali in pazienti affetti da neuroblastoma ad alto rischio.

Ho cercato di identificare dei miRNA correlati a delezioni/amplificazioni cromosomiche associate a specifici andamenti clinici e outcome.

I dati ottenuti hanno evidenziato una correlazione tra la delezione a livello del cromosoma 11q e il miRNA let-7d per quanto riguarda il verificarsi di una recidiva mentre per quanto riguarda l'outcome, alterazioni a livello del cromosoma 8 sono state correlate con miRNA quali miR-106b e miR-146b.

Tali correlazioni potrebbero trovare campo non solo in ambito diagnostico e nello studio dell'andamento della malattia, ma potrebbero anche fornire nuovi bersagli terapeutici e consentire il disegno di protocolli terapeutici innovativi per i pazienti a prognosi più sfavorevole.

Sono necessarie indagini più approfondite per validare il valore prognostico dei marcatori identificati per il neuroblastoma ad alto rischio e per valutare la loro applicabilità in ambito clinico.

## 7. Bibliografia

1. Morini M, Cangelosi D, Segalerba D, Marimpietri D, Raggi F, Castellano A, et al. Exosomal microRNAs from Longitudinal Liquid Biopsies for the Prediction of Response to Induction Chemotherapy in High-Risk Neuroblastoma Patients: A Proof of Concept SIOPEX Study. *Cancers*.
2. Tolbert VP, Matthay KK. Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment. *Cell Tissue Res*. 2018.
3. Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, et al. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primer*. 2016.
4. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. Neuroblastoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version. In: PDQ Cancer Information Summaries. 2002.
5. Sorrentino S, Conte M, Garaventa A. Neuroblastoma: Percorso Diagnostico, Terapeutico e Assistenziale. UOC Oncologia Pediatrica, Istituto Giannina Gaslini;
6. Shimada H, Umehara S, Monobe Y, Hachitanda Y, Nakagawa A, Goto S, et al. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*. 2001.
7. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009.
8. Brodeur GM. Spontaneous regression of neuroblastoma. *Cell Tissue Res*. 2018.
9. Sorrentino S, Conte M, Avanzini S, Granata C, Mazzocco K, Piccardo A, et al. Neuroblastoma e tumori neuroblastici periferici. *Area Pediatr*. 2019.
10. Carella SM. esperienza preliminare dell'UO di Oncoematologia Pediatrica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana".
11. Vantaku V, Donepudi SR, Ambati CR, Jin F, Putluri V, Nguyen K, et al. Expression of ganglioside GD2, reprogram the lipid metabolism and EMT phenotype in bladder cancer. *Oncotarget*. 2017.
12. Whittle SB, Smith V, Doherty E, Zhao S, McCarty S, Zage PE. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2017.
13. Louis CU, Shohet JM. Neuroblastoma: Molecular Pathogenesis and Therapy. *Annu Rev Med*. 2015;
14. Huertas-Castaño C, Gómez-Muñoz MA, Pardo R, Vega FM. Hypoxia in the Initiation and Progression of Neuroblastoma Tumours. *Int J Mol Sci*. 2019.
15. Tolbert VP, Coggins GE, Maris JM. Genetic susceptibility to neuroblastoma. *Curr Opin Genet Dev*. 2017.
16. Tonini GP, Capasso M. Genetic predisposition and chromosome instability in neuroblastoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2020.
17. Barr EK, Applebaum MA. Genetic Predisposition to Neuroblastoma. *Children*. 2018;
18. Johnsen JI, Dyberg C, Wickström M. Neuroblastoma—A Neural Crest Derived Embryonal Malignancy. *Front Mol Neurosci*. 2019.
19. Ritenour LE, Randall MP, Bosse KR, Diskin SJ. Genetic susceptibility to neuroblastoma: current knowledge and future directions. *Cell Tissue Res*. 2018;

20. Matthay KK, George RE, Yu AL. Promising Therapeutic Targets in Neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2012;
21. Carpenter EL, Mossé YP. Targeting ALK in neuroblastoma—preclinical and clinical advancements. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012.
22. Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013.
23. Cheung N-KV, Dyer MA. Neuroblastoma: Developmental Biology, Cancer Genomics, and Immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2013;
24. Molenaar JJ, Domingo-Fernández R, Ebus ME, Lindner S, Koster J, Drabek K, et al. LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nat Genet.* 2012.
25. Zhi F, Wang R, Wang Q, Xue L, Deng D, Wang S, et al. MicroRNAs in neuroblastoma: small-sized players with a large impact. *Neurochem Res.* 2014.
26. Buhagiar A, Ayers D. Chemoresistance, Cancer Stem Cells, and miRNA Influences: The Case for Neuroblastoma. *Anal Cell Pathol Amst.* 2015.
27. Ramraj SK, Aravindan S, Somasundaram DB, Herman TS, Natarajan M, Aravindan N. Serum-circulating miRNAs predict neuroblastoma progression in mouse model of high-risk metastatic disease. *Oncotarget.* 2016.
28. Ognibene M, Morini M, Garaventa A, Podestà M, Pezzolo A. Identification of a minimal region of loss on chromosome 6q27 associated with poor survival of high-risk neuroblastoma patients. *Cancer Biol Ther.*
29. Amoroso L, Ognibene M, Morini M, Conte M, Di Cataldo A, Tondo A, et al. Genomic coamplification of CDK4/MDM2/FRS2 is associated with very poor prognosis and atypical clinical features in neuroblastoma patients. *Genes Chromosomes Cancer.* 2020;
30. Lasorsa VA, Cimmino F, Ognibene M, Mazzocco K, Erminio G, Morini M, et al. 19p loss is significantly enriched in older age neuroblastoma patients and correlates with poor prognosis. *Npj Genomic Med.* 2020.
31. Naraparaju K, Kolla V, Zhuang T, Higashi M, Iyer R, Kolla S, et al. Role of microRNAs in epigenetic silencing of the CHD5 tumor suppressor gene in neuroblastomas. *Oncotarget.* 2016.
32. Zheng L, Zhang Y, Lin S, Sun A, Chen R, Ding Y, et al. Down-regulation of miR-106b induces epithelial-mesenchymal transition but suppresses metastatic colonization by targeting Prrx1 in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015.
33. Yu L-X, Zhang B-L, Yang M-Y, Liu H, Xiao C-H, Zhang S-G, et al. MicroRNA-106b-5p promotes hepatocellular carcinoma development via modulating FOG2. *OncoTargets Ther.* 2019.
34. Yang C, Dou R, Yin T, Ding J. MiRNA-106b-5p in human cancers: diverse functions and promising biomarker. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 2020.
35. Ma X-L, Zhang X-J, Du Q, Zhang X-N, Zhang S-Y, Zhao H-F. microRNA-146b promotes neuroblastoma cell growth through targeting NUMB. *Exp Ther Med.* giugno 2020.
36. Down-regulation of HPGD by miR-146b-3p promotes cervical cancer cell proliferation, migration and anchorage-independent growth through activation of STAT3 and AKT pathways | *Cell Death & Disease.*
37. Villamón E, Berbegall AP, Piqueras M, Tadeo I, Castel V, Djos A, et al. Genetic Instability and Intratumoral Heterogeneity in Neuroblastoma with MYCN Amplification Plus 11q Deletion. *PLoS ONE* 2013.
38. Mlakar V, Jurkovic Mlakar S, Lopez G, Maris JM, Ansari M, Gumy-Pause F. 11q deletion in neuroblastoma: a review of biological and clinical implications. *Mol Cancer.* 2017.

39. Sanmartín E, Muñoz L, Piqueras M, Sirerol JA, Berlanga P, Cañete A, et al. Deletion of 11q in Neuroblastomas Drives Sensitivity to PARP Inhibition. *Clin Cancer Res*. 2017.
40. De Preter K, Vandesomepele J, Menten B, Carr P, Fiegler H, Edsjö A, et al. Positional and functional mapping of a neuroblastoma differentiation gene on chromosome 11. *BMC Genomics*. 2005.
41. Yue Z-X, Xing T-Y, Gao C, Liu S-G, Zhao W, Zhao Q, et al. Chromosome band 11q23 deletion predicts poor prognosis in bone marrow metastatic neuroblastoma patients without MYCN amplification. *Cancer Commun*. 2019.
42. Powers JT, Tsanov KM, Pearson DS, Roels F, Spina CS, Ebright R, et al. Multiple mechanisms disrupt the let-7 microRNA family in neuroblastoma. *Nature*. 2016.
43. Buechner J, Tømte E, Haug BH, Henriksen JR, Løkke C, Flægstad T, et al. Tumour-suppressor microRNAs let-7 and mir-101 target the proto-oncogene MYCN and inhibit cell proliferation in MYCN-amplified neuroblastoma. *Br J Cancer*. 2011.
44. Saeki N, Saito A, Sugaya Y, Amemiya M, Sasaki H. Indirect Down-regulation of Tumor-suppressive let-7 Family MicroRNAs by LMO1 in Neuroblastoma. *Cancer Genomics Proteomics*. 2018.

# Ringraziamenti

Un sentito grazie a tutte le persone che mi hanno permesso di arrivare fin qui e di portare a termine questo lavoro di tesi.

In primis, un ringraziamento al mio relatore Prof. A. Ravelli per la disponibilità e la tempestività ad ogni mia richiesta.

Un ringraziamento particolare va alla mia correlatrice Dott.ssa A. Eva che mi ha seguito, con la sua infinita disponibilità e pazienza, in ogni step della realizzazione dell'elaborato.

Grazie anche al Prof. A. Garaventa per avermi dato la possibilità di svolgere il mio lavoro di tesi su un argomento così interessante e per il supporto costante, alla Dott.ssa M. Morini per i suoi preziosi consigli, al Dott. N. Zanardi per l'aiuto a interfacciarmi con la statistica e l'informatica e a tutto il team Neuroblastoma, che lavora incessantemente e con grande dedizione.

Ringrazio infinitamente mia madre e mio padre, che mi hanno sempre sostenuto, appoggiando ogni mia decisione, fin dalla scelta del mio percorso di studi, senza i loro insegnamenti e senza il loro supporto questo percorso non sarebbe stato possibile.

Grazie anche a tutta la mia famiglia e ai miei nonni, pilastri della mia crescita personale e forti sostenitori della mia carriera medica. Esempi vivente del fatto che dopo ogni difficoltà, grande o piccola che sia, ci si deve sempre rialzare, senza mai arrendersi.

Grazie a mio fratello Luca che con una semplice battuta è sempre riuscito a sdrammatizzare i momenti di sconforto e tensione e a gioire con me per i miei successi.

Grazie a Laura, ad Alessandra, a Gabriele e a Fabiola che mi hanno sempre supportato e sopportato in ogni momento. Senza i loro consigli, il loro appoggio e la loro immancabile simpatia non ce l'avrei mai fatta.

Un grazie di cuore alla mia collega nonché amica Chiara Bonzano, con cui ho condiviso tutto. Grazie per aver ascoltato i miei sfoghi, grazie per tutti i momenti di spensieratezza e serenità.

Infine, grazie a tutti i miei amici e colleghi di corso che in un modo o nell'altro hanno contribuito a questo mio traguardo.