



**U.O.:** Ostetricia e Ginecologia 1 e 2  
**Direttori:** Prof. Enrico Sartori - Prof. Franco E. Odicino  
**Tel:** 0303995482 – 0303995341  
**Email:** [ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicivi.it](mailto:ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicivi.it)

## Identificazione di profili di miRNA sierici associati ai meccanismi di riparo del DNA tramite ricombinazione omologa nel carcinoma sieroso ovarico di alto grado (Ova HR-MiR)

Il carcinoma ovarico rappresenta la quinta causa di morte per cancro tra le donne in tutto il mondo e comprende diversi sottotipi, che sono considerati malattie diverse. Il carcinoma ovarico sieroso di alto grado (HGSOC) è il tipo istologico più comune e aggressivo e, frequentemente diagnosticato a stadio avanzato, è responsabile della maggior parte dei decessi, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni inferiore al 30%. Lo sviluppo subdolo della malattia che porta a una diagnosi tardiva e l'elevata incidenza di recidive anche dopo il trattamento standard, costituito dalla citoreduzione chirurgica seguita da chemioterapia a base di platino, sono le principali cause della sua prognosi infausta (1). Negli ultimi cinque anni, i risultati di studi clinici randomizzati internazionali hanno dimostrato l'efficacia di una nuova classe di farmaci a bersaglio molecolare, gli inibitori dell'enzima Poli ADP-ribosio polimerasi (PARPi), somministrati come terapia di mantenimento dopo risposta al trattamento a base di platino. Gli enzimi del gruppo PARP hanno un ruolo fondamentale nella riparazione della rottura del DNA a singolo filamento e se sono bloccati dai PARPi, la rottura viene convertita in una rottura del DNA a doppio filamento che deve essere poi riparato mediante la via di riparazione della ricombinazione omologa (HR) (2). Se un paziente presenta dei difetti nei meccanismi di riparo tramite ricombinazione omologa (HRD), come nel caso di una mutazione nei geni BRCA1 o BRCA2, diventa più sensibile ai PARPi mediante un processo di letalità sintetica.

Questi farmaci sono entrati a far parte della terapia standard di prima linea del HGSOC, aumentando in modo significativo la sopravvivenza delle pazienti (3-4). Le mutazioni patogenetiche nel gene BRCA e i difetti nei meccanismi dell'HR, determinati su tessuto tumorale, sono presenti in circa il 50% dei HGSOC e rappresentano biomarcatori prognostici e predittivi di risposta al trattamento con PARPi (5). Le pazienti con HGSOC si possono quindi classificare in i) BRCA-



**U.O.:** Ostetricia e Ginecologia 1 e 2  
**Direttori:** Prof. Enrico Sartori - Prof. Franco E. Odicino  
**Tel:** 0303995482 – 0303995341  
**Email:** [ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicivi.it](mailto:ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicivi.it)

mutate, ii) BRCA non mutate o wild-type (BRCA-WT) con difetti nel riparo del DNA tramite ricombinazione omologa (HRD-positive) e iii) BRCA-WT senza difetti nel riparo del DNA tramite ricombinazione omologa (HRD-negative). Queste tre classi di pazienti mostrano un gradiente di risposta alla terapia con platino e PARPi, in particolare le pazienti BRCA-mutate sono caratterizzate da un maggior vantaggio in termini di sopravvivenza libera da progressione, seguite dalle pazienti BRCA-WT HRD-positive, mentre il beneficio clinico nelle pazienti BRCA-WT HRD-negative sembra essere più limitato (6). Queste alterazioni molecolari vengono determinate al momento della diagnosi di HGSOC, quando la malattia è in stadio avanzato e c'è ampia disponibilità di tessuto tumorale su cui effettuare tali analisi. Nell'eventualità di una recidiva o progressione neoplastica, molto spesso il tessuto non è disponibile perché raramente le pazienti con HGSOC vengono risottoposte a chirurgia (per diversi motivi, come estensione della recidiva, presenza di patologie concomitanti, etc), ma vengono nuovamente indirizzate a chemioterapia con successive linee terapeutiche. Sarebbe importante, tuttavia, cercare di ottenere informazioni sulle alterazioni molecolari che caratterizzano la recidiva di malattia, per scegliere la miglior sequenza di farmaci che possano combattere i nuovi cloni tumorali che si sono sviluppati. Infatti è molto probabile che la recidiva di malattia rispetto alla malattia alla diagnosi rappresenti un'evoluzione del tumore caratterizzata da nuove e diverse alterazioni molecolari, che si sviluppano sotto la pressione selettiva della chemioterapia (7).

In questo contesto la “biopsia liquida”, che definisce la possibilità di effettuare analisi molecolari su un liquido corporeo (generalmente sangue venoso), può rappresentare una fonte alternativa di materiale di origine tumorale (ad es. DNA, RNA) laddove il tessuto non sia disponibile. Altri vantaggi della biopsia liquida rispetto a quella tissutale sono i) la minima invasività del prelievo, ii) il potenziale di rappresentare l'eterogeneità dei cloni tumorali, grazie alla capacità di raccogliere molecole provenienti da diverse popolazioni cellulari e siti di neoplasia, iii) la ripetibilità del prelievo non invasivo nel tempo, per il monitoraggio della risposta ai trattamenti e della prognosi. A



**U.O.:** Ostetricia e Ginecologia 1 e 2  
**Direttori:** Prof. Enrico Sartori - Prof. Franco E. Odicino  
**Tel:** 0303995482 – 0303995341  
**Email:** [ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicili.it](mailto:ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicili.it)

differenza di altri tumori solidi dove la biopsia liquida, principalmente l'analisi del DNA tumorale circolante, viene utilizzata in pratica clinica per il monitoraggio della risposta ai farmaci (8), ad oggi questo tipo di analisi non è stata ancora implementata routinariamente nel HGSOC, anche se rimane un interessante ambito di ricerca.

Dalla loro scoperta nel 2001, evidenze scientifiche hanno mostrato che i microRNA (miRNA) possano fungere da biomarcatori diagnostici, prognostici e di risposta ai trattamenti nel cancro. I miRNA sono piccoli trascritti non codificanti (19-25 nucleotidi) che agiscono come regolatori genici, modulando l'attività post trascrizionale di più mRNA target. Le ultime indagini hanno scoperto che i miRNA possono spostarsi dal tessuto tumorale alla circolazione sanguigna, dove vengono rilevati in modo affidabile grazie alla loro estrema stabilità e resistenza agli enzimi RNasi. Negli ultimi anni, diversi gruppi di ricerca, compreso il nostro, hanno identificato miRNA circolanti come potenziali biomarcatori con implicazioni nella diagnosi, prognosi e risposta al trattamento nel carcinoma ovarico (9-10). Questi biomarcatori circolanti possono essere altamente informativi e rappresentativi dell'eterogeneità tissutale e dell'evoluzione del tumore durante il trattamento farmacologico e potrebbero quindi potenzialmente fornire al clinico nuovi strumenti per un efficace monitoraggio delle pazienti in trattamento. A supporto di questa ipotesi, un lavoro di Aprile 2023 pubblicato da un gruppo di ricerca dell'University Hospital of Heidelberg riporta come i miRNA circolanti nel plasma di pazienti con carcinoma ovarico siano migliori potenziali biomarcatori surrogati di biopsia liquida rispetto al DNA tumorale circolante (11). Questa osservazione è in linea con la biologia di HGSOC, caratterizzata da basso carico mutazionale ma da alta instabilità genomica causata da aberrazioni cromosomiche, che possono riflettersi a livello trascrittomico in specifici profili di miRNA.

Nella letteratura scientifica pubblicata fino ad oggi non esistono dati riguardanti profili di miRNA sierici che caratterizzino i difetti nel riparo del DNA tramite HR nelle pazienti con HGSOC.



**U.O.:** Ostetricia e Ginecologia 1 e 2  
**Direttori:** Prof. Enrico Sartori - Prof. Franco E. Odicino  
**Tel:** 0303995482 – 0303995341  
**Email:** [ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicivi.it](mailto:ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicivi.it)

Analogamente, non esiste uno studio che abbia confrontato l'espressione di miRNA HR-relati nel siero delle pazienti con HGSOC a diagnosi e a recidiva, per esplorare le eventuali variazioni nel loro livello di espressione.

## Obiettivi dello studio

Gli obiettivi dello studio sono:

- 1) Identificare con metodica *high-throughput* profili di miRNA sierici che caratterizzino al momento della diagnosi le tre popolazioni di pazienti affette da HGSOC, in base al loro status di alterazioni di BRCA e pathway HR (BRCA-mutate, BRCA-WT HRD-positive, BRCA-WT HRD-negative) all'interno di una coorte clinicamente rappresentativa di circa 100 pazienti.
- 2) Validare con la tecnologia della quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) i miRNA sierici maggiormente espressi e altamente specifici per ciascuna popolazione.
- 3) Valutare l'espressione dei miRNA validati popolazione-specifici in prelievi di siero delle stesse pazienti al momento della recidiva/progressione di malattia.

## Disegno dello studio

Lo studio verrà sviluppato nell'arco di 24 mesi presso l'Istituto di Medicina Molecolare "A. Nocivelli" afferente alla Divisione di Ostetricia e Ginecologia della ASST Spedali Civili di Brescia. Dall'archivio di materiale biologico dell'Istituto di Medicina Molecolare "A. Nocivelli" verranno selezionati i sieri di 100-120 pazienti con HGSOC classificate come "BRCA-mutate", "BRCA-WT HRD-positive" o "BRCA-WT HRD-negative" mediante il Myriad My Choice HRD test, unico



**U.O.:** Ostetricia e Ginecologia 1 e 2  
**Direttori:** Prof. Enrico Sartori - Prof. Franco E. Odicino  
**Tel:** 0303995482 – 0303995341  
**Email:** [ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicivi.it](mailto:ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicivi.it)

assay approvato da FDA dal 2019 e presente nelle linee guida internazionali sul trattamento del carcinoma ovarico. Tutte le pazienti che verranno incluse nello studio hanno firmato il consenso informato per la raccolta e l'utilizzo di materiale biologico (Studio PROBIOGINE-NP1284).

L'RNA totale arricchito in miRNA verrà estratto dal siero e i profili di espressione dei miRNA verranno ottenuti grazie alla tecnologia GeneChip miRNA v.4.0 Array (ThermoFisher Scientific). Dopo analisi statistica, i miRNA differenzialmente espressi saranno validati con la tecnologia della (qRT-PCR) e la chimica Locked Nucleic Acid (LNA)-based miRNA-specific primers (Exiqon), utilizzando protocolli ben consolidati nel nostro laboratorio (9). Con lo stesso procedimento di qRT-PCR verranno quantificati i miRNA HR-relati nei campioni di siero delle pazienti al momento della recidiva/progressione di malattia. I dati clinici e patologici verranno ricavati dalle cartelle cliniche delle pazienti e verranno utilizzati per la correlazione con i miRNA espressi.

### **Popolazione in studio**

La popolazione in studio sarà costituita da donne affette da HGSOC che soddisfino i seguenti criteri:

#### **Criteri di inclusione:**

- Classificazione delle pazienti in “BRCA mutate”, “BRCA-WT HRD-positive” o “BRCA-WT HRDnegative” mediante il test Myriad My Choice HRD
- Disponibilità di un campione di siero prelevato al momento della diagnosi, prima di qualunque trattamento. Disponibilità del campione di siero a recidiva/progressione di malattia
- Disponibilità di dati clinico-patologici

#### **Criteri di esclusione:**



**U.O.:** Ostetricia e Ginecologia 1 e 2  
**Direttori:** Prof. Enrico Sartori - Prof. Franco E. Odicino  
**Tel:** 0303995482 – 0303995341  
**Email:** [ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicivi.it](mailto:ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicivi.it)

- Storia clinica di un altro cancro invasivo (non ovarico) sviluppato nei due anni precedenti
- Presenza di un altro tumore sincrono al momento della diagnosi

### Risultati attesi

Ci aspettiamo di identificare i profili di miRNA caratteristici di ciascuna delle tre classi di pazienti con HGSO: i) BRCA-mutate, ii) BRCA-WT HRD-positive e iii) BRCA-WT HRD-negative. Questo studio potrebbe costituire la prima evidenza scientifica riguardante i miRNA circolanti nel siero come biomarcatori di biopsia liquida potenzialmente informativi sullo stato di funzionamento del pathway di riparo del DNA tramite ricombinazione omologa, un essenziale marcatore prognostico e predittivo di risposta ai trattamenti nelle pazienti con HGSO che di routine viene testato solo su tessuto tumorale.

La quantificazione al momento della recidiva/progressione di malattia dell'espressione dei miRNA identificati e il confronto con i livelli al momento della diagnosi costituirà analogamente la prima evidenza scientifica riguardante eventuali variazioni nell'espressione di miRNA HR-relati, da correlare con le caratteristiche cliniche delle pazienti e la risposta ai trattamenti.

### Bibliografia

- 1) Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC et al. Ovarian cancer. Lancet 2014 Oct 11;384(9951):1376-88.
- 2) Creeden JF, et al. Homologous recombination proficiency in ovarian and breast cancer patients. BMC Cancer. 2021;21:1154.



**U.O.:** Ostetricia e Ginecologia 1 e 2  
**Direttori:** Prof. Enrico Sartori - Prof. Franco E. Odicino  
**Tel:** 0303995482 – 0303995341  
**Email:** [ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicivi.it](mailto:ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicivi.it)

- 3) Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, et al. ENGOT-OV16/NOVA Investigators. Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2016 Dec 1;375(22):2154-2164.
- 4) Moore K, Colombo N, Scambia G et al, Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2018; 379:2495-2505.
- 5) Xie T, Dickson KA, Yee C, et al. Targeting Homologous Recombination Deficiency in Ovarian Cancer with PARP Inhibitors: Synthetic Lethal Strategies That Impact Overall Survival. *Cancers (Basel).* 2022 Sep 23;14(19):4621.
- 6) Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2019; 381:2416-2428
- 7) Cunnea P, Curry EW, Christie EL, et al. Spatial and temporal intra-tumoral heterogeneity in advanced HGSOE: Implications for surgical and clinical outcomes. *Cell Rep Med.* 2023 May 16:101055.
- 8) Souza VGP, Forder A, Brockley LJ, et al. Liquid Biopsy in Lung Cancer: Biomarkers for the Management of Recurrence and Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2023 May 17;24(10):8894.
- 9) Todeschini P, Salviato E, Paracchini L, et al. Circulating miRNA landscape identifies miR-1246 as promising diagnostic biomarker in high-grade serous ovarian carcinoma: A validation across two independent cohorts. *Cancer Lett.* 2017 Mar 1;388:320-327.
- 10) Vigneron N, Vernon M, Meryet-Figuère M, et al. Predictive Relevance of Circulating miR-622 in Patients with Newly Diagnosed and Recurrent High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. *Clin Chem.* 2020 Feb 1;66(2):352-62. PMID: 32040573.



Presidio Ospedaliero  
di Brescia

Sistema Socio Sanitario



Regione  
Lombardia

ASST Spedali Civili



Università  
degli Studi  
di Brescia

**U.O.:** Ostetricia e Ginecologia 1 e 2  
**Direttori:** Prof. Enrico Sartori - Prof. Franco E. Odicino  
**Tel:** 0303995482 – 0303995341  
**Email:** [ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicivi.it](mailto:ostetricia.ginecologia2@asst-spedalivicivi.it)

11) Gahlawat AW, Witte T, Sinn P, et al. Circulating cf-miRNA as a more appropriate surrogate liquid biopsy marker than cfDNA for ovarian cancer. Sci Rep. 2023 Apr 4;13(1):5503.

Preventivo costi totali (100-120 campioni): 40.000 Euro