

IRCCS  
CLINICAL  
Cancer Centre

**Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico**

CENTRO DI RIFERIMENTO ONCOLOGICO DELLA BASILICATA

Rionero in Vulture (PZ)



REGIONE BASILICATA

---

DIREZIONE SCIENTIFICA

## **CARATTERIZZAZIONE DELLE VESICIOLE EXTRACELLULARI NEL SARCOMA EPITELIOIDE**

### **1. Descrizione e contesto del progetto**

Il sarcoma epitelioide è una rara e aggressiva neoplasia dei tessuti molli ad istogenesi sconosciuta per la quale le attuali terapie sono estremamente deludenti. La proposta di questo progetto, si basa sull'intento dell'Associazione "Orchestra per la Vita" Aps, di avvicinare la comunità dei pazienti e delle loro famiglie, alla ricerca scientifica con l'obiettivo di trovare sinergie che possano portare a migliori metodi per una diagnosi specifica e precoce, e a migliori cure. La biopsia liquida, ad oggi, risulta essere un approccio innovativo e non invasivo per diagnosticare e monitorare i pazienti consentendo di superare i limiti della biopsia convenzionale. In particolare, nell'ambito della biopsia liquida, le vescicole extracellulari (EVs), rappresentano una componente importante dello scambio di informazioni tra le cellule. La letteratura evidenzia come le EVs e il loro contenuto, essendo abbondanti e altamente stabili nei fluidi biologici, potrebbero essere utilizzate come biomarcatori tumorali minimamente invasivi che offrono una finestra diagnostica multicomponente.

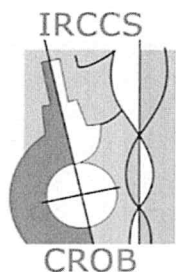
### **2. Ambito del progetto**

Si ipotizza che i recenti progressi tecnologici applicati nella ricerca scientifica di tipo preclinico e traslazionale, permetteranno di individuare nuovi possibili biomarcatori tumorali per la diagnosi precoce, e nuovi farmaci più efficaci per questa patologia.

### **3. Requisiti di alto livello**

I seguenti requisiti guideranno il progetto di ricerca in ogni sua fase:

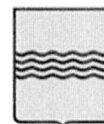
- Trasparenza negli aspetti comunicativi con l'Associazione "Orchestra per la Vita" Aps;
- Tempistiche definite da un cronoprogramma;
- Trasparenza negli aspetti economici;



**Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico**

CENTRO DI RIFERIMENTO ONCOLOGICO DELLA BASILICATA

Rionero in Vulture (PZ)



REGIONE BASILICATA

---

DIREZIONE SCIENTIFICA

#### **4. Introduzione sul sarcoma epitelioido**

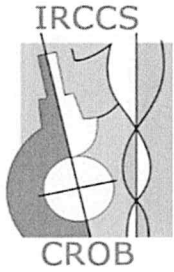
Il sarcoma epitelioido è una rara e aggressiva neoplasia dei tessuti molli ad istogenesi sconosciuta, che presenta caratteristiche istologiche che ricordano sia la differenziazione mesenchimale che quella epiteliale [1]. Si manifesta più spesso nei tessuti molli di bambini, adolescenti e giovani adulti, con caratteristiche cliniche e istopatologiche distintive [2,3]. I pazienti presentano una predisposizione alla recidiva locale, alla diffusione metastatica ai linfonodi loco-regionali ed ai polmoni. L'età media di insorgenza è all'incirca di 27 anni, tuttavia rappresenta il 2% dei sarcomi pediatrici dei tessuti molli [4,5]. Il sarcoma epitelioido viene classificato in due sottotipi: distale e prossimale. Il primo si sviluppa principalmente nelle estremità anatomiche distali; il secondo insorge nei siti prossimali del tronco [5,6]. In uno studio retrospettivo su 67 bambini, adolescenti e giovani adulti (età media 14 anni) con sarcoma epitelioido, circa il 20% presentava tumore metastatico il resto, malattia localizzata. Di questi, circa l'85% è andato incontro a remissione completa dopo terapia (chirurgica, chemio/radio-terapia), tuttavia, ad un anno il 50 % ha recidivato. Inoltre, nei pazienti metastatici la sopravvivenza a 5 anni è risultata essere solo del 9% [7].

Da un punto di vista immunoistochimico, si caratterizzano per l'espressione di marcatori sia mesenchimali che epiteliali e, nella metà dei casi, esprimono il biomarcatore CD34.

Il sarcoma epitelioido presenta, inoltre, nella quasi totalità dei casi, l'inattivazione biallelica dell'oncosoppressore SMARCB1. L'assenza di SMARCB1 causa l'attivazione di "segnali molecolari di cancerogenesi" quali: WNT/Beta-catenina, Sonic hedgehog e Polycomb [8]. Da un punto di vista terapeutico, il trattamento ordinario si basa sull'intervento chirurgico associato o meno alla radioterapia, nei casi di patologia in fase avanzata viene utilizzata la chemioterapia sistemica [2,9,10,11].

Nel tentativo di migliorare la diagnosi, prevedere una recidiva o eventualmente il trattamento terapeutico in corso, una delle strategie potrebbe essere l'utilizzo della biopsia liquida.

La biopsia liquida consiste nell'isolamento e nell'analisi di materiali di derivazione tumorale [cellule tumorali circolanti (CTC), DNA libero circolante (cfDNA) e vescicole extracellulari (EVs)] nei fluidi corporei, come sangue, urina e saliva, e offre interessanti opportunità per l'identificazione di nuovi biomarcatori diagnostici e prognostici. Attualmente, la biopsia liquida non è impiegata nella routine clinica, ma il suo potenziale è oggetto di numerosi studi. Le EVs sono particelle sferiche delimitate da un doppio strato lipidico eterogeneo in termini di dimensioni (diametro compreso tra 30 e 10000 nm), biogenesi e composizione. Le EVs sono una componente importante dello scambio di informazioni tra



---

DIREZIONE SCIENTIFICA

cellule e trasportano diverse molecole bioattive, come proteine, lipidi, metaboliti e acidi nucleici (RNA codificanti/non codificanti, DNA genomico e mitocondriale). Le EVs, con il loro specifico contenuto, che rispecchia le cellule di origine e il loro stato fisiologico o patologico, potrebbero essere considerate delle vere e proprie "biopsie cellulari" che veicolano le informazioni sul tumore. Pertanto, è stato dimostrato che le EVs e il loro contenuto, essendo abbondanti e altamente stabili nei fluidi biologici, potrebbero essere utilizzate come biomarcatori tumorali minimamente invasivi. Complessivamente, lo scopo di questo progetto è isolare e caratterizzare le EVs e il loro contenuto, dapprima *in vitro* utilizzando modelli pre-clinici, successivamente dal siero di pazienti affetti da sarcoma epitelioide per identificare nuovi potenziali biomarcatori essenziali per la diagnosi/prognosi del tumore.

## 5. Fasi del progetto

Il progetto si suddivide nelle seguenti fasi:

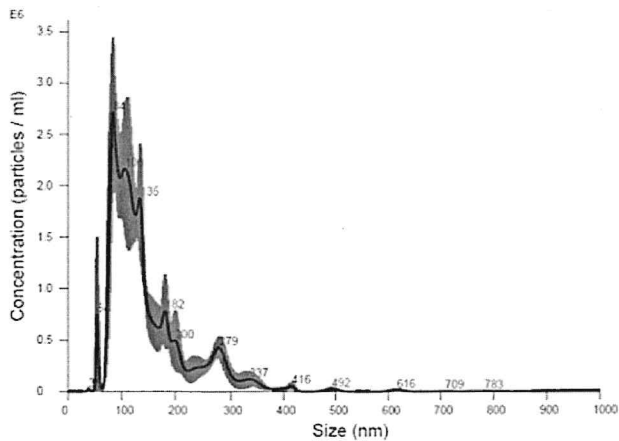
1. Poiché, ad oggi, non sono presenti dati in letteratura in merito alle EVs derivate da sarcoma epitelioide, si procederà all'isolamento e alla caratterizzazione del contenuto molecolare delle EVs stesse. Il primo step prevede l'utilizzo di linee cellulari di sarcoma distale e prossimale per valutare quantità, dimensione e contenuto (proteine e acidi nucleici) delle EVs.
2. Successivamente, le EVs saranno isolate dal siero di pazienti con ES e da donatori sani. Il numero e il contenuto di EVs sarà confrontato tra i due gruppi. Tutti i dati ottenuti saranno correlati con le caratteristiche cliniche dei pazienti.

## 6. Dati preliminari

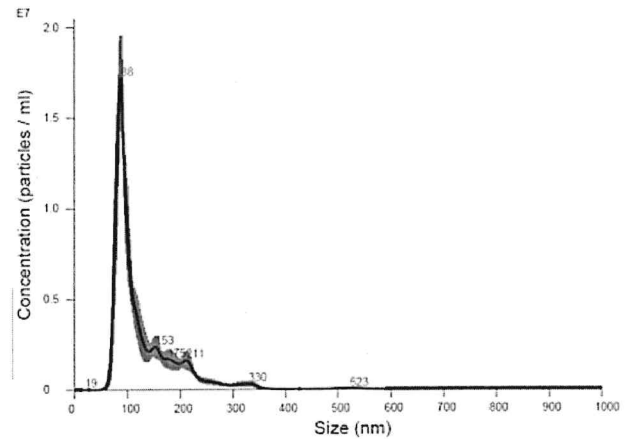
Le EVs sono state isolate dalla linea cellulare VA-ES-BJ. Le cellule sono state piastrate a due diverse densità (A:  $1,2 \times 10^6$  e B:  $2,4 \times 10^6$ ) e tenute in coltura senza siero per 48 h. Dopo 48 h, le cellule sono state contate e le EVs isolate dal surnatante mediante vari step di centrifugazione. Dopo l'isolamento, le EVs sono state quantizzate mediante Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Per la prima condizione di densità cellulare (FIGURA A) sono state quantizzate  $2,2 \times 10^8$  EVs/ml di surnatante ( $3 \times 10^6$  cellule) con una dimensione media di 146,8 nm; per la seconda densità cellulare (FIGURA B), la concentrazione di EVs è pari a  $9,23 \times 10^8$  EVs/ml di surnatante ( $6,5 \times 10^6$  cellule) con una dimensione media di 126,8 nm.

DIREZIONE SCIENTIFICA

A



B




## 7. Comunicazione

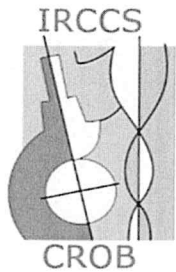
La comunicazione tra IRCCS-CROB e l'Associazione "Orchestra per la Vita" Aps è considerata elemento fondamentale del progetto.

L'attività comunicativa si estrinsecherà nel seguente modo:

1. Invio via PEC di un breve rapporto trimestrale dell'attività svolta;
2. Organizzazione di un WEBINAR con l'Associazione (via piattaforme quali GOTO WEBINAR, SKYPE o WhatsApp ... da definire successivamente) una settimana dopo il rilascio del rapporto trimestrale con lo scopo di spiegarne il contenuto e le linee future di azione.
3. Saranno pianificate delle attività di informazione, sensibilizzazione e promozione nelle quali saranno illustrate le finalità, gli obiettivi, i risultati attesi e raggiunti, la ricaduta.
4. Saranno utilizzati canali di comunicazione e divulgazione di tipo convenzionale quali: presenze a conferenze e convegni a tema nei quali verranno illustrati i risultati raggiunti.

Il Direttore Scientifico



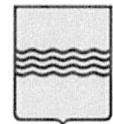


MOECI  
CLINICAL  
Cancer Centre

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico

CENTRO DI RIFERIMENTO ONCOLOGICO DELLA BASILICATA

Rionero in Vulture (PZ)



REGIONE BASILICATA

---

DIREZIONE SCIENTIFICA

## Bibliografia

- 1 Sakharpe, A. *et al.* (2011) Epithelioid sarcoma and unclassified sarcoma with epithelioid features: clinicopathological variables, molecular markers, and a new experimental model. *Oncologist* 16, 512–522
- 2 Stacchiotti, S. *et al.* (2019) Comparative Assessment of Antitumor Effects and Autophagy Induction as a Resistance Mechanism by Cytotoxics and EZH2 Inhibition in INI1-Negative Epithelioid Sarcoma Patient-Derived Xenograft. *Cancers (Basel)* 11,
- 3 Fletcher, C.D. *et al.* (2002) World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone.
- 4 Needs, T. and Fillman, E.P. (2019) Cancer, Epithelioid Sarcoma. In *StatPearls* Publishing
- 5 Chbani, L. *et al.* (2009) Epithelioid sarcoma: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 106 cases from the French sarcoma group. *Am. J. Clin. Pathol.* 131, 222–227
- 6 Hasegawa, T. *et al.* (2001) Proximal-type epithelioid sarcoma: a clinicopathologic study of 20 cases. *Mod. Pathol.* 14, 655–663
- 7 Sparber-Sauer, M. *et al.* (2019) Epithelioid sarcoma in children, adolescents, and young adults: Localized, primary metastatic and relapsed disease. Treatment results of five Cooperative WeichteilsarkomStudiengruppe (CWS) trials and one registry. *Pediatr. Blood Cancer* 66, e27879
- 8 Kohashi, K. and Oda, Y. (2017) Oncogenic roles of SMARCB1/INI1 and its deficient tumors. *Cancer Sci.* 108, 547–552
- 9 Asano, N. *et al.* (2015) Prognostic Value of Relevant Clinicopathologic Variables in Epithelioid Sarcoma: A Multi-Institutional Retrospective Study of 44 Patients. *Ann. Surg. Oncol.* 22, 2624–2632
- 10 Jawad, M.U. *et al.* (2009) Prognostic factors for survival in patients with epithelioid sarcoma: 441 cases from the SEER database. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 467, 2939–2948
- 11 Tian, Z. *et al.* (2019) Safety and efficacy of combination therapy with apatinib and doxorubicin in metastatic soft tissue sarcomas: an observational study from multiple institutions. *Cancer Manag. Res.* 11, 5293–5300