

IL MICROBIOTA IN GLIOMI H3K27M: ANALISI DELLE INTERAZIONI E IMPLICAZIONI NELLA STORIA DI MALATTIA

Introduzione

La classificazione WHO del 2016 ha introdotto nuove entità riconoscibili dal punto di vista del profilo molecolare tra cui il glioma diffuso della linea mediana con mutazione H3K27 (DMG). I DIPG sono caratterizzati dalla stessa mutazione istonica nella maggior parte dei casi e in precedenti versioni classificazione WHO erano classificati a parte.

All'interno del protocollo di studio DIPG-2015 attivo presso INT-Milano è stato messo a punto uno studio ancillare sul microbiota dei pazienti con DIPG. Sono stati conservati campioni di feci raccolte alla diagnosi, al termine della radioterapia e a 6 mesi dal suo termine o alla progressione di malattia. L'obiettivo innovativo di questa parte della ricerca traslazionale è monitorare l'ecosistema microbico intestinale per dimostrare l'esistenza di elementi alterati nella sua composizione associati all'evoluzione di malattia, attraverso:

- I. raccolta di campioni di feci sfruttando appositi raccoglitori che consentono di preservare campione in apposito tampone stabilizzante;
- II. identificazione e quantificazione delle specie batteriche attraverso approccio di sequenziamento massivo parallelo di nuova generazione;
- III. analisi della struttura delle comunità microbiche individuando unità tassonomiche operative.

L'ipotesi è, inoltre, la possibilità di identificare, a titolo esplorativo, un profilo di microbiota iniziale che correli con la prognosi. Contestualmente, sono stati registrati anche dati sullo stato del paziente che possano influire sul microbiota, quali assunzione di antibiotici e steroidi.

Si suppone che la modifica del microbiota, anche attraverso una variazione della dieta del soggetto, possa rappresentare un elemento di intervento personalizzato per migliorare il controllo di malattia.

Metodi

Casistica

Lo studio DIPG-2015-INT (EudraCT: 2015-002185-23; ClinicalTrials.gov: NCT03620032) è uno studio monocentrico attivo presso la Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano. Lo studio attivo dal 2015 prevede l'arruolamento di pazienti affetti da glioma diffuso intrinseco del ponte (DIPG) e da glioma della linea mediana (DMG). Lo studio è stato approvato dal comitato etico dell'istituto (CE N. INT 07/12) e il consenso informato è stato fornito ai parenti o ai tutori legali. I pazienti iscritti allo studio sono randomizzati in due braccia per la terapia, standard e sperimentale di radioterapia, gold standard per questi tumori:

- i) il braccio standard combina una dose totale di 54 Gy frazionati dalla settimana 3 alla settimana 9 in concomitanza con il trattamento sistemico con nimotuzumab e vinorelbina. Un secondo ciclo di radioterapia sarà somministrato alla progressione;
- ii) il braccio sperimentale prevede tre cicli di radioterapia: un primo ciclo di 36 Gy suddiviso in 20 frazioni giornaliere, associate un trattamento sistemico con il nimotuzumab e la vinorelbina; gli altri due cicli di radioterapia di 19,8 Gy (1,8 Gy/fr) sono somministrati a partire dalle settimane 25 e 45, nel mentre i pazienti continuano a ricevere lo stesso trattamento sistemico.

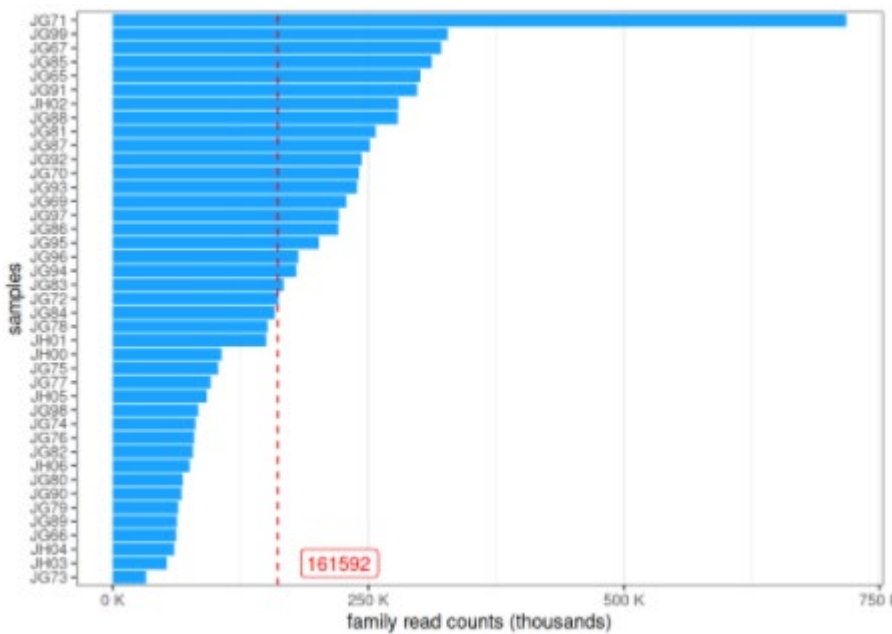
Lo studio è stato condotto su 18 pazienti (10 pazienti DIPG e 8 pazienti DMG) arruolati in uno dei due bracci dello studio.

Risultati

Library size

Per il progetto e' stato sequenziato il microbiota di 41 campioni appartenenti a 18 pazienti.

Nel diagramma riportato di seguito vediamo quante reads vengono allineate su genoma batterico (a livello tassonomico di *family*, *genus* e *species*). Viene indicata in rosso la library size mediana della casistica. Nello studio vengono riportati dati fino al livello di specie benché risentano delle limitazioni dovute alla tecnica con problemi nel riconoscimento a livello di specie che in regioni ipervariabili del 16S differiscono per 1 nucleotide.



Library size a livello di famiglia

Analisi appaiata post vs pre

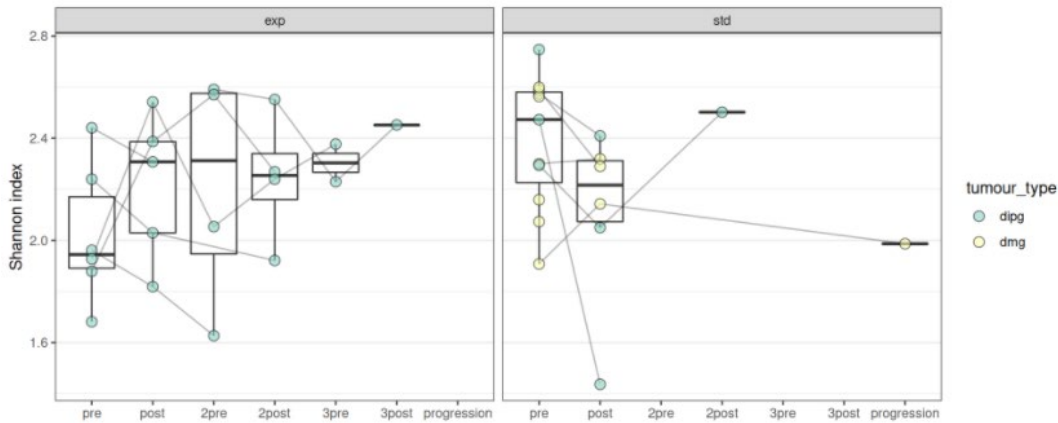
α -diversity (41 campioni) con indice di Shannon

L'inferenza tassonomica è preceduta dal raggruppamento delle sequenze in base ad una predeterminata soglia di similarità, ottenendo così le operational taxonomic unit (OTU). Si calcola la distanza tra le sequenze, intesa come distanza genetica e cioè come misura quantitativa della divergenza tra due sequenze. Attraverso queste misure è possibile procedere con il clustering. Innanzitutto viene calcolato un coefficiente che esprima la similarità tra i dati, in seguito si rappresenta graficamente l'associazione tra i dati simili (mediante alberi gerarchici o mediante gruppi). Il risultato finale del clustering è che le sequenze che identificano diversi generi si raggruppano in diverse OTU. Le OTU con un tasso di diversità entro il 3% sono considerate rappresentative della stessa specie, mentre entro il 5% sono da considerarsi formate da geni provenienti da organismi probabilmente di specie diversa ma dello stesso genere. Il numero delle OTU ottenuto è indice dell'abbondanza e della diversità tassonomica di una certa comunità microbica.

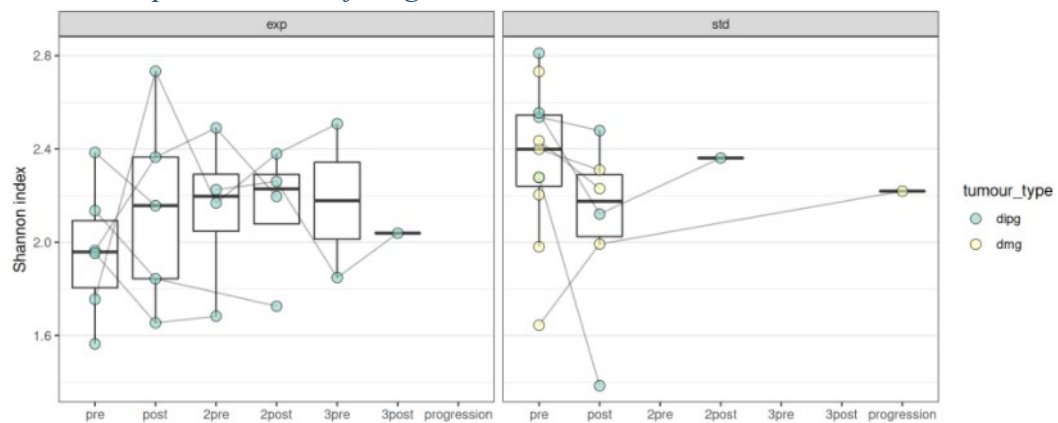
L'indice di Shannon di α -diversity indica quanti batteri diversi sono presenti all'interno di un campione (*richness*) aggiustando per la loro frequenza (*evenness*). Più è alto l'indice, maggiore è la ricchezza di batteri diversi all'interno di un campione.

Nei grafici sottostanti ogni punto rappresenta un campione, mentre le linee collegano un paziente. L'asse x rappresenta i vari punti di raccolta nel tempo, mentre l'asse y rappresenta l'indice di Shannon di α -diversity.

Essendo la numerosità della casistica molto ridotta e, come evidente dai grafici sotto, essendo molto difficile seguire la raccolta dei campioni di un paziente oltre il primo ciclo di trattamenti, ci concentreremo esclusivamente sui punti di raccolta **pre-post** radioterapia (27 campioni corrispondenti a 18 pazienti).



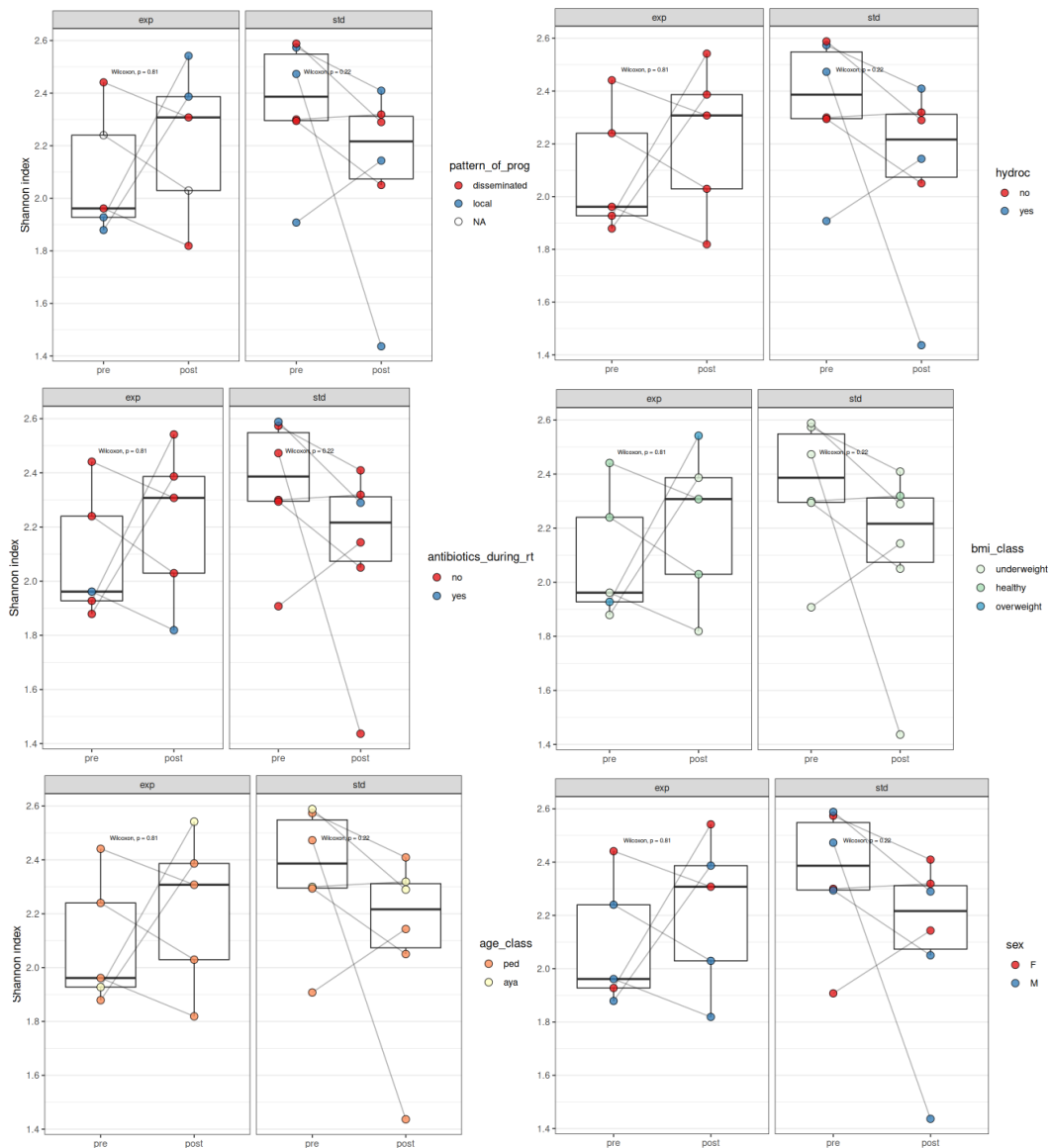
Box-plot relativo ad alfa diversity calcolato con indice di Shannon su 41 campioni divisi per braccio di radioterapia a livello di famiglie



Box-plot relativo ad alfa diversity calcolato con indice di Shannon su 41 campioni divisi per braccio di radioterapia a livello di genere

α -diversity (27 campioni)

Come spiegato poco sopra, per le analisi seguenti si considereranno solo i 27 campioni raccolti ai primi due punti pre e post. Ogni punto rappresenta un campione, mentre le linee collegano un paziente. Per testare differenze a livello di α -diversity fra campioni pre e post-RT all'interno di ogni braccio è stato usato un test di Wilcoxon per campioni appaiati.



Box-plot di α -diversity pre e post radioterapia (braccio standard e sperimentale) a livello di famiglia, associate a parametri: 1-pattern of progression; 2-Hydrocefalus; 3-ATB during RT; 4-BMI class; 5-Age class; 6-gender

β -diversity:

Le analisi di β -diversity sono volte a rappresentare le distanze, e quindi la diversità, fra i diversi campioni della casistica in base alla loro composizione microbica. Punti nel grafico più vicini fra loro indicano campioni più simili, viceversa punti più distanti indicano campioni con composizioni microbiche più diverse. Nel nostro caso, è stata applicata una tecnica di *multi-dimensional scaling* con distanza di *Bray-Curtis* (o *indice di dissomiglianza di Bray-Curtis*, una statistica utilizzata per quantificare la dissomiglianza di composizione tra due diversi siti), ottenendo così una rappresentazione bi-dimensionale (Dim1 e Dim2) dei dati microbici.

Nel grafico sotto, i vari campioni sono rappresentati con dei cerchi o dei triangoli a seconda che siano pre o post-RT rispettivamente. Le linee collegano campioni dello stesso paziente, mentre i colori identificano le varie caratteristiche cliniche.

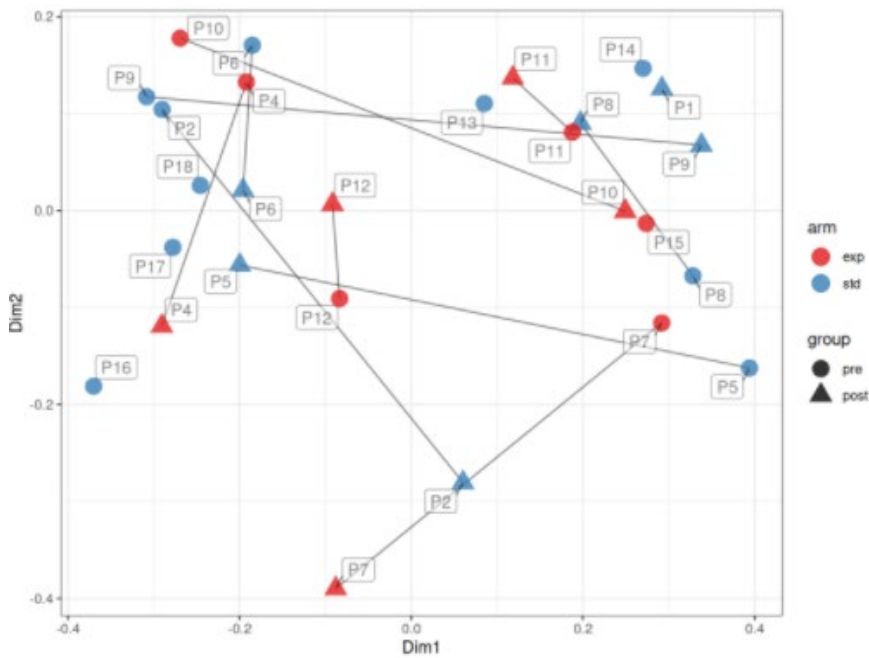


Figura Grafico di beta diversity a livello di famiglie

DA analysis

È stata svolta un'analisi al fine di determinare quali taxa batterici siano differenzialmente abbondanti (DA) fra i campioni pre e post-RT, tenendo conto ovviamente dell'informazione intra-paziente (analisi per campioni dipendenti). Come per le precedenti analisi, sono stati indagati tutti e tre i livelli di tassonomia: *family*, *genus* e *species*.

Faremo due confronti post vs pre:

- considerando solo i campioni del braccio standard
- considerando solo i campioni del braccio sperimentale

Un \log_2 fold-change (LFC) positivo indica una presenza maggiore di un determinato batterio nei post-RT, mentre al contrario un LFC negativo indica una diminuzione di abbondanza di un batterio dopo il trattamento. Sulla base di questi dati sono stati elaborati i grafici di cui sotto.

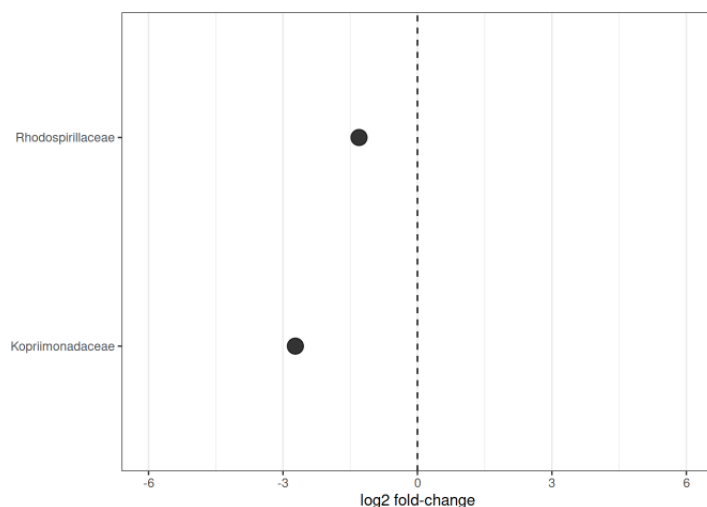


Grafico DA in \log_2 fold-change per generi nel braccio std. Sono evidenziati solo quelli con p -value > 0.05

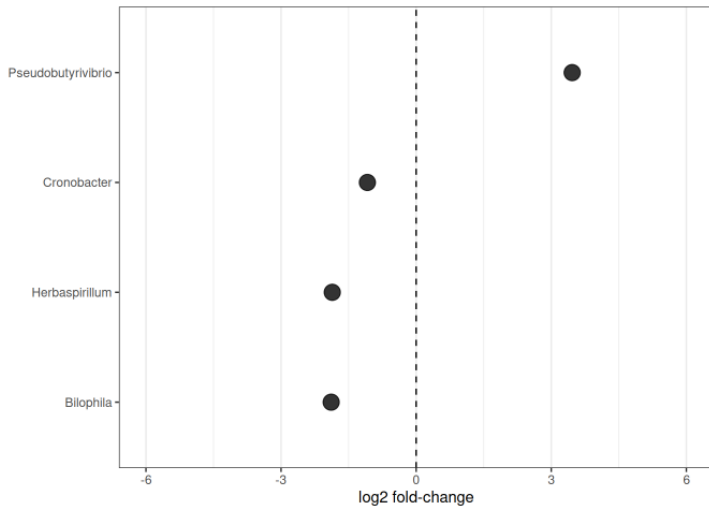


Grafico DA in log2 fold-change per famiglie nel braccio std. Sono evidenziati solo quelli con p-value > 0.05

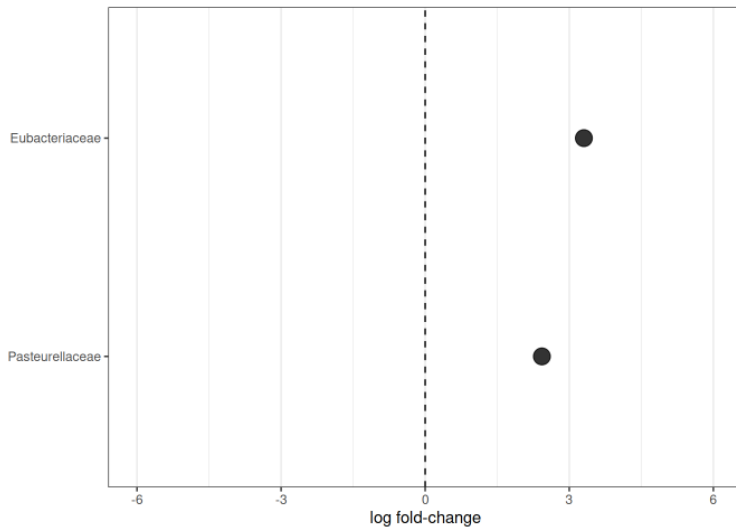


Grafico DA in log2 fold-change per generi nel braccio exp. Sono evidenziati solo quelli con p-value > 0.05

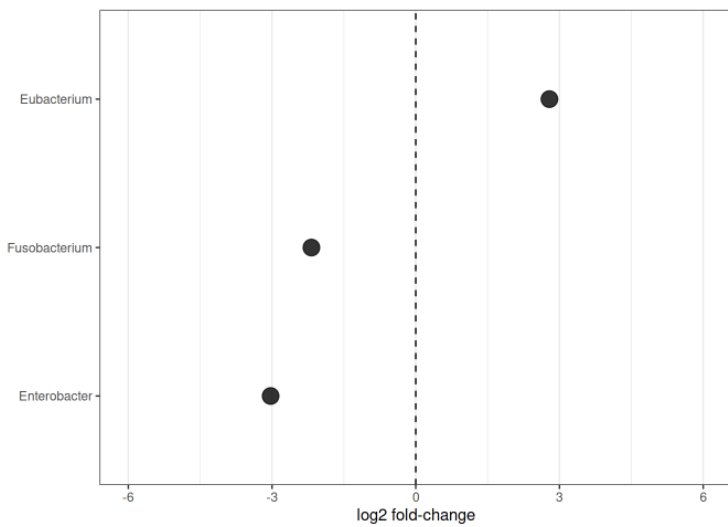
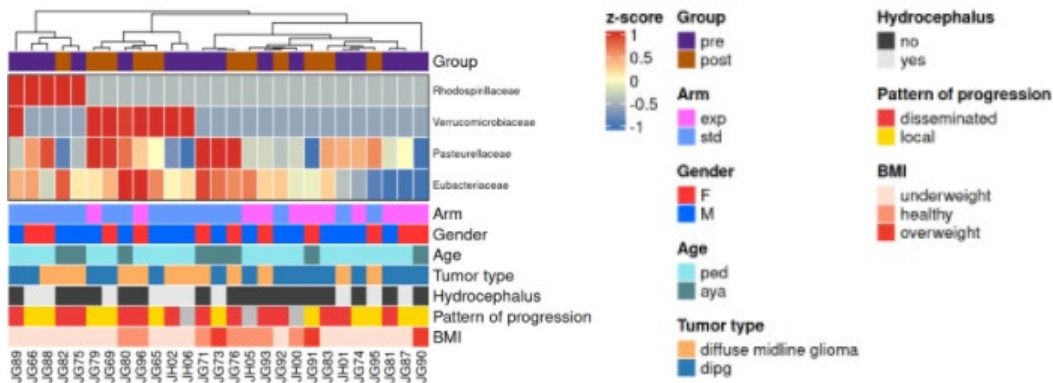


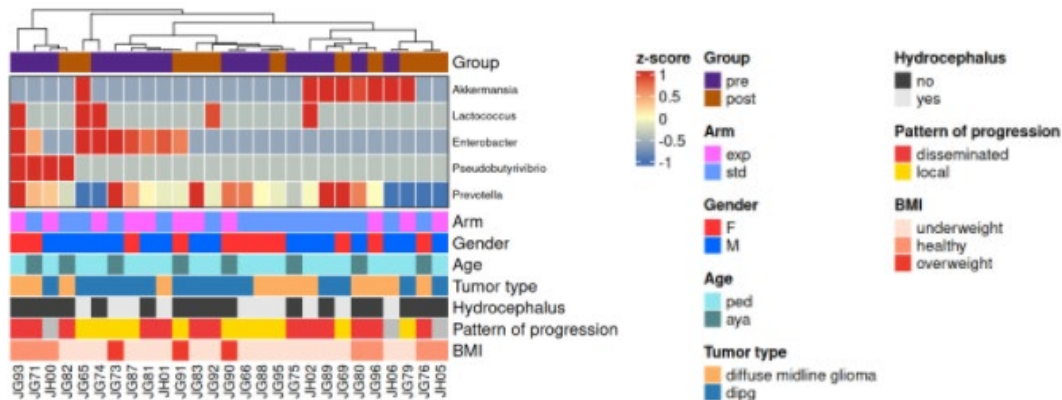
Grafico DA in log2 fold-change per famiglie nel braccio exp. Sono evidenziati solo quelli con p-value > 0.05

Heatmap:



Heatmap a livello di famiglia

È stata realizzata una heatmap, una rappresentazione grafica dei dati di una stessa matrice tramite diverse colorazioni. È possibile evidenziare tramite la distribuzione in figura, l'evidenza o assenza di un pattern specifico di distribuzione secondo un parametro.



Heatmap a livello di genere

Conclusioni

La radioterapia è la modalità principale utilizzata per il trattamento in gliomi H3K27M. Anche se sono stati fatti notevoli progressi nello sviluppo della radioterapia, i suoi principali limiti rimangono l'efficacia e la sicurezza. Fattori come le dimensioni del tumore o la differenziazione del tumore sono responsabili di una parte dell'eterogeneità nella risposta alle radiazioni tra i pazienti. A questi vanno aggiunti fattori biologici, come la radioresistenza intrinseca, l'ipossia, l'infiltrazione di cellule infiammatorie e i cambiamenti dell'immunità dell'ospite nel microambiente tumorale. La radioterapia è anche associata a effetti collaterali tossici che influenzano negativamente la qualità della vita dei pazienti. Tra i fattori di rischio identificati per lo sviluppo di tossicità ci sono quelli legati alla terapia (dose di radiazioni, volume, frazione e sito, e terapie concomitanti) e quelli legati ai pazienti (ad es età, sesso).

Il microbioma intestinale può influenzare sia l'efficacia sia la gravità delle tossicità indotte dal trattamento. La composizione del microbiota può modificare l'efficacia e il profilo di tossicità così come, al contrario, anche le modalità di trattamento hanno numerosi effetti sulla flora gastrointestinale. È stato dimostrato che il microbioma intestinale influenza l'efficacia e la tossicità della radioterapia attraverso diversi meccanismi, principalmente modulando la risposta immunitaria. Questo studio si prefigge di identificare i componenti chiave del microbiota intestinale che potrebbero influenzare la risposta a trattamenti in pazienti DIPG; in questo modo sarebbe possibile la progettazione di interventi per migliorare la risposta alla terapia. La comprensione dell'influenza dei componenti del microbiota intestinale sull'efficacia della terapia aiuterà a progettare interventi per migliorare la cura dei pazienti DIPG.

Le analisi sulla variazione del microbioma intestinale nei pazienti con DMG o DIPG al momento forniscono indicazioni preliminari sulle modificazioni radioterapia-relate. Per analizzare l'ipotesi secondo la quale monitorare le variazioni del microbiota durante il percorso terapeutico possa costituire una metodica non-invasiva per monitorare lo stato del paziente e cambiamenti a livello immune legati all'andamento della malattia sarebbero necessarie ulteriori analisi implementando la casistica.