



Premessa

Nell'ultimo decennio, l'oncologia pediatrica ha visto una crescente integrazione delle scienze omiche (genomica, trascrittomica, epigenomica e microbiomica) nei percorsi di ricerca e, progressivamente, nella pratica clinica. Questa evoluzione è stata resa possibile dall'avanzamento delle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione e dall'adozione di piattaforme bioinformatiche sempre più performanti, in grado di gestire grandi moli di dati complessi e trasformarli in informazioni clinicamente rilevanti.

Accanto alla caratterizzazione molecolare dei tumori, che ha permesso una classificazione più precisa e lo sviluppo di terapie mirate, è emerso un crescente interesse per il ruolo del microbiota, in particolare quello intestinale, nella modulazione della risposta terapeutica e nel decorso clinico dei pazienti oncologici. Parallelamente, la sfida diagnostica dei tumori cerebrali pediatrici, e in particolare del medulloblastoma, richiede strumenti rapidi, accurati e applicabili su campioni clinici di routine, spesso limitati a materiale fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE).

Il nostro lavoro si colloca in questo scenario innovativo. Il primo affronta lo sviluppo e la validazione di un workflow bioinformatico open-source, basato su QIIME2, per l'analisi del microbioma intestinale mediante sequenziamento multi-amplicon del gene 16S rRNA. Il secondo esplora l'applicazione di tecnologie di sequenziamento "long-reads" su campioni FFPE di medulloblastoma, con l'obiettivo di migliorare la classificazione molecolare di questi tumori. Entrambi i lavori si caratterizzano per l'alto grado di innovazione e per la rilevanza delle ricadute potenziali nella ricerca e nella pratica clinica.

Profilazione multi-amplicon 16S rRNA con QIIME2 nei campioni fecali pediatrici

Questo studio descrive in dettaglio la creazione e la validazione di una pipeline bioinformatica completamente open-source per l'analisi del microbioma intestinale. L'approccio si basa su multi-amplicon del gene 16S rRNA, che permette di ottenere una caratterizzazione tassonomica più fine e rappresentativa rispetto ai tradizionali approcci basati su singole regioni ipervariabili.

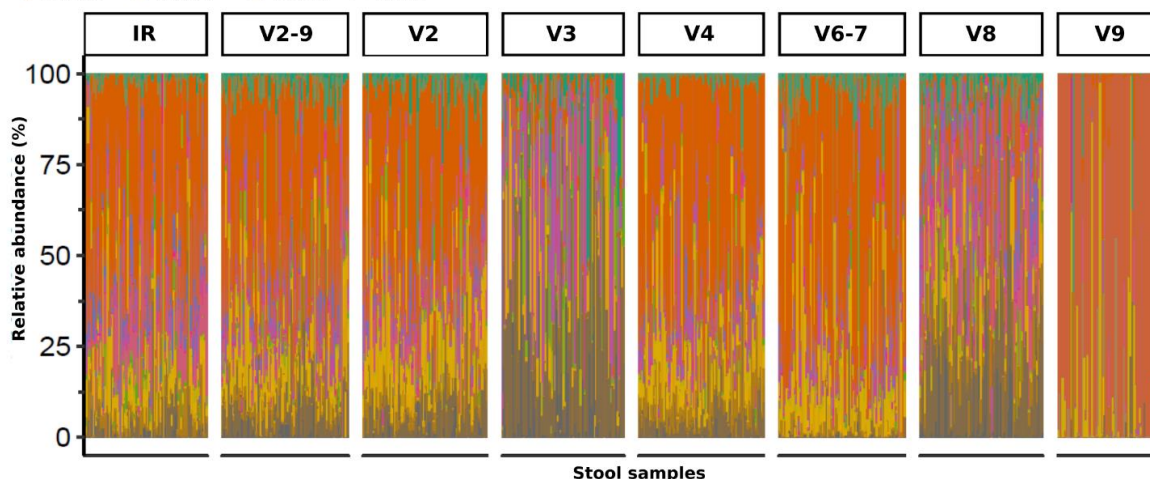
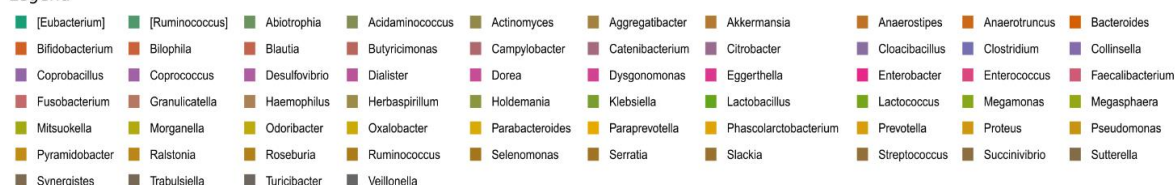
Contesto e razionale: Il microbioma intestinale ha assunto un ruolo di crescente importanza in oncologia pediatrica. Studi precedenti hanno evidenziato come la composizione microbica possa influenzare lo sviluppo di alcune neoplasie, modulare la risposta immunitaria e persino condizionare l'efficacia e la tossicità dei trattamenti chemioterapici e immunoterapici. Nonostante ciò, la ricerca in questo ambito è spesso ostacolata da metodologie analitiche poco standardizzate e dalla dipendenza da software proprietari che limitano la riproducibilità e la trasparenza dei risultati. Da qui nasce l'esigenza di un workflow aperto, documentato e validato, come quello proposto dagli autori.

Materiali e metodi: Lo studio ha incluso 91 campioni fecali provenienti da pazienti pediatrici affetti da tumori del sistema nervoso centrale e dai loro caregiver. I campioni sono stati raccolti in kit stabilizzanti, processati per l'estrazione del DNA e analizzati mediante sequenziamento 16S rRNA su piattaforma Ion GeneStudio S5. I dati grezzi sono stati elaborati con Ion Reporter e con una pipeline QIIME2 che prevedeva denoising con DADA2, classificazione tassonomica con database Greengenes e SILVA, e successiva fusione dei profili multi-amplicon.

Risultati principali: La pipeline QIIME2 ha mostrato un'elevata concordanza con Ion Reporter in termini di profondità di sequenziamento, identificazione dei taxa e stima della diversità microbica (Figura1). Sono stati generati oltre 700 profili tassonomici regione-specifici, resi disponibili in un repository pubblico insieme a una versione dockerizzata del workflow.



Legend



Implicazioni: Lo studio dimostra la validità e la riproducibilità di un approccio open-source, rendendo disponibile alla comunità scientifica uno strumento trasparente e facilmente condivisibile. Questo apre la strada a studi futuri volti a esplorare il ruolo del microbiota nella prognosi e nella risposta terapeutica dei tumori pediatrici.

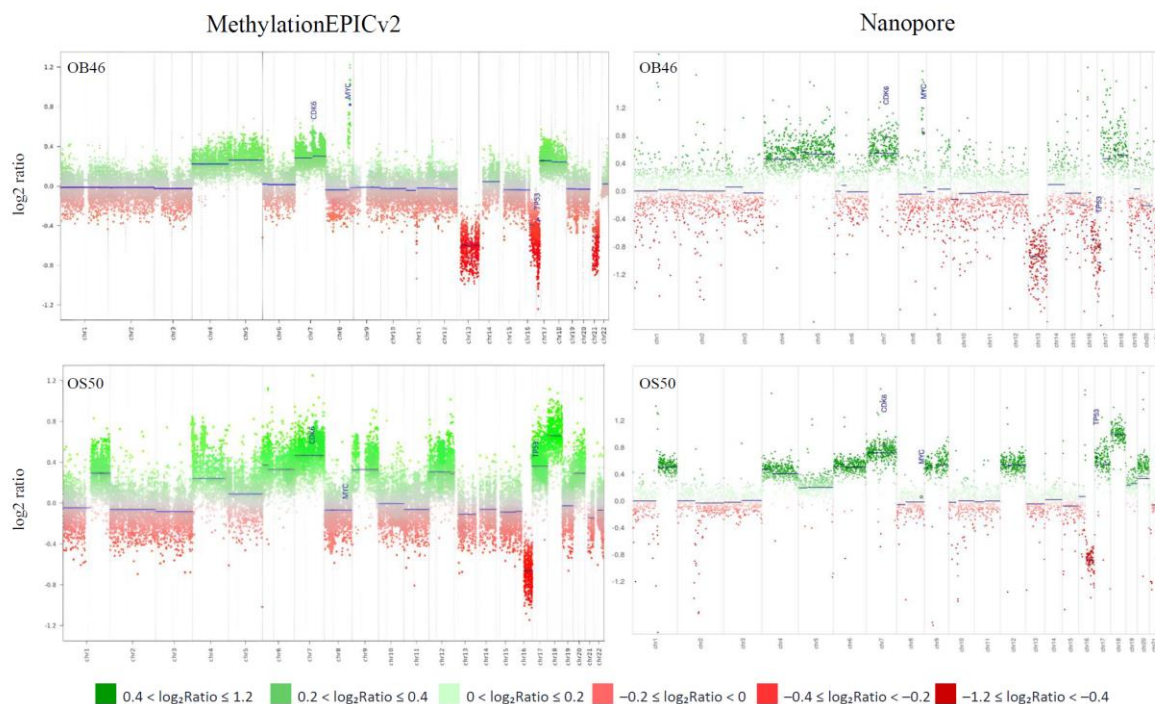
Classificazione per medulloblastoma mediante sequenziamento Nanopore di campioni FFPE

abbiamo affrontato il tema della classificazione molecolare per medulloblastoma, tumore cerebrale pediatrico tra i più comuni e aggressivi. La corretta identificazione del sottogruppo molecolare è fondamentale per la prognosi e per la scelta terapeutica, ma fino a oggi tale classificazione si è basata principalmente su array di metilazione o su campioni di tessuto fresco congelato.

Contesto e razionale: Il medulloblastoma è un tumore eterogeneo suddiviso in sottogruppi molecolari con prognosi differenti. L'analisi basata su profili di metilazione è lo standard attuale, ma l'uso dei campioni FFPE rappresenta una sfida a causa della degradazione del DNA. In questo scenario, il sequenziamento Oxford Nanopore Technologies (ONT) offre una nuova opportunità.

Materiali e metodi: Sono stati analizzati 12 campioni FFPE di medulloblastoma ad alto rischio. Il DNA è stato processato secondo il protocollo RRMS e sequenziato su piattaforma GridION. I dati sono stati elaborati con le pipeline nanoDx e Sturgeon e confrontati con piattaforme di riferimento come Illumina EPIC v2.0 e il classificatore DKFZ.

Risultati principali: nanoDx ha mostrato una concordanza sostanziale con i dati di riferimento ($\kappa = 0.802$), mentre Sturgeon ha ottenuto un accordo moderato. Le variazioni del numero di copie (CNV) di geni come MYC, TP53 e CDK6 sono state rilevate con buona concordanza tra ONT e array EPIC (Figura2). Tutti i campioni FFPE sono stati analizzati con successo, dimostrando la robustezza del metodo.



Implicazioni: Questo studio rappresenta una prova di concetto che dimostra la fattibilità del sequenziamento ONT su campioni clinici FFPE, proponendolo come complemento rapido ed economico agli array di metilazione. La possibilità di utilizzare tessuti FFPE di routine amplia notevolmente l'applicabilità clinica, con ricadute dirette nella diagnosi e nella gestione terapeutica del medulloblastoma.

Conclusioni

Entrambi i lavori rappresentano progressi significativi verso una medicina di precisione in oncologia pediatrica. Il primo dimostra come strumenti open-source, standardizzati e trasparenti possano democratizzare l'accesso all'analisi del microbioma, creando basi solide per la ricerca traslazionale. Il secondo conferma la possibilità di applicare tecnologie di sequenziamento di ultima generazione anche su campioni clinici tradizionali come gli FFPE, abbattendo barriere tecniche e migliorando l'accessibilità della classificazione molecolare. Insieme, questi studi evidenziano il potenziale di un approccio integrato multi-omico come chiave per migliorare la prognosi e la gestione clinica dei tumori pediatrici.

Loris De Cecco

Maura Massimino

Milano, 20/08/2025