



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE E MOLECOLARI

Dottorato di ricerca
Curriculum Human Health
XXXIV Ciclo
Tesi finale

Miglioramento delle strategie di trattamento dei Tumori

Epiteliali Timici (TETs)

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa Rossana Berardi

Dottoranda:

Dott.ssa Giulia Ricci

a.a. 2020/2021

INDICE

1. Riassunto.....	3
2. Introduzione.....	6
2.1 Epidemiologia e fattori di rischio.....	6
2.2 Anatomia normale e funzionale.....	7
2.3 Anatomia patologica nei TETs.....	9
2.4 Patogenesi molecolare.....	13
2.5 Diagnosi, stadiazione e prognosi.....	15
2.6 Strategie terapeutiche in uso e nuove prospettive di cura.....	16
2.6.1 Trattamenti anti-angiogenici ed in particolare anti-VEGFR.....	19
2.6.2 Fattori prognostici e predittivi di risposta a terapie anti-angiogenetiche.....	20
2.7 Il miglioramento della gestione dei TETs: l'importanza dell'approccio multidisciplinare e la nascita della rete TYME.....	22
3 Pazienti e metodi.....	24
3.1. Studio retrospettivo.....	24
3.1.1 Analisi della casistica di pazienti.....	24
3.1.2 Analisi degli SNPs.....	26
3.2 Studio prospettico.....	29
3.2.1 Disegno dello studio e pazienti.....	29
3.2.2 Analisi traslazionali previste dallo studio e metodiche di laboratorio.....	33
4 Risultati.....	37
4.1. Studio retrospettivo.....	37
4.2. Studio prospettico.....	42
5 Discussione.....	46
6 Conclusioni.....	52
7 Bibliografia.....	53

1. Riassunto

Background: I tumori epiteliali del timo (TETs) sono malattie rare ed estremamente eterogenee da un punto di vista biologico. Il differente comportamento osservato all'interno dei TETs è legato ad una diversa responsività ai trattamenti e alla diversa biologia dei vari sottotipi, argomento che rimane ampiamente sconosciuto. La letteratura testimonia come nelle neoplasie epiteliali timiche siano presenti alterazioni genetiche e vie di segnalazione cellulare implicate nella carcinogenesi e pertanto importanti nello sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Alcuni studi si focalizzano sulla sperimentazione di nuove terapie basate su approcci anti-angiogenici, in particolare anti-VEGF, fattore di crescita endoteliale vascolare, overespresso in questi tumori.

Nonostante gli avanzamenti nella conoscenza della biologia dei TETs, un'approfondita indagine appare necessaria al fine di acquisire maggiori competenze in merito alle caratteristiche biomolecolari implicate con l'insorgenza della malattia e di identificare nuovi potenziali biomarcatori dal ruolo prognostico o predittivo di risposta ai trattamenti, in particolare anti-angiogenetici.

Pazienti e metodi:

Lo studio oggetto della presente tesi è costituito da una parte retrospettiva e da una parte prospettica.

Studio retrospettivo: è stata eseguita l'analisi di una casistica di 78 pazienti con TETs afferenti alla Clinica Oncologica dell'Università Politecnica delle Marche - AOU Ospedali Riuniti di Ancona (41 femmine e 37 maschi, 60 timomi e 18 carcinomi timici). Sul DNA estratto da campioni di tessuto paraffinato conservati presso l'Anatomia Patologica del nostro centro, o da campioni di sangue, per un totale di 57 pazienti selezionati, sono stati analizzati i Polimorfismi a Singolo Nucleotide (SNPs) a carico di geni implicati nei processi angiogenici nel tumore, in particolare di VEGF-A, di VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2), di VEGFR-3 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3), di PDGFR- α (Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha), HIF1- α (Hypoxia Inducible Factor-1, subunità alpha). Per l'estrazione e la purificazione del DNA da tessuto è stato utilizzato il kit *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation* della ditta *ThermoFisher*. Il DNA genomico è stato estratto dal sangue mediante il kit "*Flexigene 3 ml Blood*", ditta QIAGEN. Per l'analisi di SNPs è stato seguito l'approccio *Real Time PCR*, tecnologia *TaqMan SNP Genotyping Assays* (Life Technologies). Su tali campioni, era stata eseguita analisi statistica mediante curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier.

Studio prospettico: studio multicentrico di fase II in aperto è volto a valutare l'efficacia e la sicurezza del trattamento con ramucirumab in combinazione con carboplatino e paclitaxel in prima linea in pazienti con carcinoma timico o timoma B3 con aree di carcinoma in stadio localmente avanzato o metastatico. Collateralmente, lo studio prevede la valutazione dell'espressione differenziale mediante *miRNA sequencing* di microRNA non-codificanti (miRNA) estratti da campioni di plasma di pazienti arruolati a diversi timepoints: basale (t0) e dopo 6 settimane dall'inizio del trattamento sperimentale (t1). La tecnica prevista per l'analisi dei miRNA è *miRCURY® LNA® miRNA SYBR® Green PCR*.

Risultati:

Studio retrospettivo: la frequenza dell'allele T di PDGFR- α rs35597368 (95.24%) è emersa statisticamente più alta che nella popolazione normale (86%, $p=0.012$), mentre le frequenze di HIF1- α rs2057482 C (76.98%), rs1951795 C (68.25%), rs2301113 A (68.55%), rs11158358 C (74.6%), rs12434438 A (65.87%), rs11549465 C (83.33%) sono risultate significativamente più basse rispetto alla popolazione generale (90%, 87%, 82%, 87%, 86%, 84%, 92%, rispettivamente $p<0.01$). VEGFR-3 rs307821 C era significativamente più elevato nei timomi rispetto ai carcinomi timici (79.5% vs 72%, $p=0.0371$). I seguenti fattori hanno dimostrato determinare un vantaggio in termini di sopravvivenza: VEGFR-3 rs307826 C, VEGFR-2 rs1870377 A, PDGFR- α rs35597368T/C, HIF1- α rs2301113 C, rs2057482 C/T, rs1951795 C, rs11158358 G/C, rs10873142 T/C e un diametro tumorale <5 cm.

Studio prospettico: presso il nostro centro è stato elaborato il protocollo di studio di fase II multicentrico, che è stato sottomesso al Comitato Etico previa autorizzazione dell'autorità regolatoria AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco). Dopo l'approvazione, è stato dato avvio all'arruolamento dei pazienti, attualmente in corso. Sono stati arruolati 4 pazienti affetti da carcinoma timico (3 maschi e 1 femmina), con età media alla diagnosi di 63 anni (range 51-71). Di tali pazienti sono stati raccolti i campioni di plasma al t0 e t1 su cui sono previste le analisi di *miRNA sequencing*.

Conclusioni:

Lo studio aveva lo scopo di individuare nuovi potenziali biomarcatori dal ruolo prognostico o predittivo di risposta a trattamenti anti-angiogenetici nei TETs, focalizzandosi sull'analisi di SNPs a carico di geni implicati nell'angiogenesi e sul profilo di espressione di miRNA circolanti in risposta alle terapie o in funzione di diversi outcome clinici. Dalle analisi condotte emerge che alcuni polimorfismi dei geni VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- α e HIF1- α risulterebbero in effetti

correlati con la prognosi. Tali risultati, unitamente alla valutazione dei miRNA, gettano le basi per una più approfondita conoscenza in merito ai TETs, nell'ottica di definire nuovi fattori biologici in grado di predire la prognosi o la responsività alle terapie, in particolare anti-VEGFR. Con la prosecuzione di un'intesa attività di ricerca scientifica, lo studio potrà offrire alcuni strumenti utili per lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative di successo a bersaglio molecolare, in particolare anti-angiogenetiche.

2. Introduzione:

2.1. Epidemiologia e fattori di rischio

I tumori epiteliali del timo (TETs) sono malattie rare, il tasso di incidenza annuale nel mondo varia tra 1.3 e 3.2 per milione di persone. Costituiscono lo 0.2-1.5% di tutte le neoplasie negli adulti [1] [2] [3]. L'incidenza ha avuto una stabilità dagli anni '70 fino a metà degli anni '90, con una successiva evidente deflessione. Tale evento potrebbe tuttavia essere imputabile al cambiamento dei criteri classificativi avvenuto nel periodo tra gli anni 90 e i primi anni 2000, ragion per cui nel complesso l'incidenza potrebbe ritenersi stabile nel tempo. I dati di letteratura che ad oggi abbiamo a disposizione non attestano una significativa differenza tra i valori di incidenza tra popolazione maschile e femminile.

I TETs rappresentano fenomeni di natura eccezionale in età pediatrica e tendenzialmente esordiscono nell'età adulta, raggiungendo un picco nella settima decade di vita con una massima frequenza intorno ai 30-40 e 60-70 anni [4] [5] [6] [8]. Tale andamento è in linea con l'aumentato dell'incidenza all'avanzare dell'età, fenomeno che viene generalmente riscontrato per le malattie neoplastiche e verosimilmente è conseguenza dell'accumulo di danni genetici col passare degli anni, nonostante sembrerebbe entrare in contrapposizione con la progressiva involuzione del timo che presumibilmente ridurrebbe la probabilità di trasformazione oncogenica delle sue cellule epiteliali.

Purtroppo, la rarità di tumori di questo tipo che spesso pregiudica la possibilità investire sulla conduzione di trial clinici caso-controllo, rende difficoltosa l'identificazione di fattori di rischio adeguati. Da indagini effettuate volte ad individuare patologie neoplastiche associate a timomi, non si evince una chiara correlazione con l'esposizione al fumo di sigaretta o al consumo di alcol, in quanto non sono stati riscontrati maggiori rischi di insorgenza di carcinoma polmonare e epatocarcinoma. Ad ogni modo, alcuni studi sosterrrebbero che esista un rischio maggiore per il paziente affetto da timoma di sviluppare un'altra neoplasia maligna, probabilmente annessa alla condivisione di una medesima *signature* genetica o ad una disfunzione del sistema immunitario. Tra le neoplasie maligne, si annoverano sia patologie comuni come il carcinoma polmonare, della tiroide della prostata, e linfomi, sia altre più rare quali tumori cerebrali sarcomi e leucemie. È stato stimato un rischio di 3-4 volte superiore rispetto alla popolazione generale. Per quanto concerne il sistema immunitario, recenti studi in merito alla biologia ed alla patologia di questi tumori rivelano in effetti che i TET, gruppo di neoplasie derivanti da un network di cellule epiteliali del timo (TEC), organo linfatico primario le cui proprietà straordinarie e le caratteristiche sono annesse al mantenimento dell'omeostasi del sistema

immunitario, sono spesso associati ad anomalie dello stesso come la Miastenia Grave, produzione di autoanticorpi contro recettori per l'acetilcolina, l'aplasia eritroide (PRCA) e ipogammaglobulinemia. Queste condizioni secondarie rendono particolarmente complessa la gestione della patologia.

La letteratura non riporta dati attestanti l'esposizione a specifici fattori ambientali, al lavoro, al regime alimentare adottato o ad agenti infettivi. I dati relativi a fattori di rischio di tipo genetico sono discordanti: nonostante in letteratura non emergano evidenze di aggregazioni familiari, è stato dimostrato un maggior tasso di incidenza di timoma all'interno di popolazioni asiatiche e statunitensi abitanti nelle isole del Pacifico, unitamente ad una forte associazione tra la neoplasia e l'istiocitoma maligno in popolazioni del Giappone. In termini generali, i dati di cui oggi disponiamo non supportano chiare implicazioni con infezioni di natura virale, diversamente imputabili alla comparsa di altri tumori rari. Più convincente è invece l'associazione riscontrata fra Epstein Barr Virus (EPV) e un sottogruppo di carcinomi timici, nello specifico il carcinoma timico simil-linfoepitelioma. [1] [6] [9] [10].

2.2 Anatomia normale e funzionale

Il timo è un organo impari e bilobato che trova localizzazione a livello del mediastino, anteriormente al sacco pericardico. Presenta una forma ovoidale, una colorazione grigio-rosea ed una consistenza molle, occupando la parte antero-superiore del torace. Tramite un largo legamento tiroo-timico si connette alla tiroide con la sua parte superiore. A livello posteriore, è in collegamento con la trachea, la carotide comune e il nervo laringeo inferiore; anteriormente, invece, è separato dal manubrio e dal corpo dello sterno da tessuto adiposo, estendendosi inferiormente fino al 4° 5° spazio intercostale.

Nel corso della vita, le dimensioni di questo organo sono soggette a notevoli variazioni. In particolare, il tessuto timico presenta maggiori dimensioni in età infantile, che vanno successivamente incontro ad una progressiva involuzione, pur senza scomparire del tutto in età avanzata. Il processo di involuzione del timo si conclude quasi interamente entro la seconda decade, tuttavia possono permanere quantità variabili di tessuto timico in forma di piccoli aggregati dispersi costituiti da cellule epiteliali e timociti.

Il timo viene irrorato da rami dell'arteria toracica interna e dell'arteria tiroidea inferiore e drena nelle vene toraciche interne, tiroidea, anonima destra e nei vasi linfatici satelliti. Non riceve afferenze linfatiche [11].

Il timo è suddiviso in lobuli avvolti da una capsula connettivale sottile da cui si dipartono setti nel parenchima sottostante. Ogni lobo è costituito da una zona corticale, più voluminosa, e da una midollare; quest'ultima prosegue nella porzione più centrale di ciascun lobulo continuandosi con quella di altri lobuli. Le zone midollari si riconoscono morfologicamente come aree più chiare.

Il timo viene definito organo "linfo-epiteliale", poiché presenta due componenti distinte: una epiteliale (di origine endodermica) e una linfocitaria (linfociti T in diverse fasi maturative) strettamente annesse da un punto di vista spaziale e funzionale. Le cellule epiteliali si suddividono a loro volta in diversi tipi, ciascuno delle quali caratterizza comparti microambientali anatomicamente e funzionalmente distinti: la *zona sottocapsulare*, la *zona corticale* e la *zona midollare*. All'interno dei tre diversi compartimenti, il profilo immunofenotipico dei timociti si modifica in relazione al processo di maturazione dal precursore alla cellula T cui va incontro. *La zona capsulare* è una zona ad alto tasso proliferativo in cui i timociti hanno aspetto blastico ed elevato indice mitotico, tipico delle prime fasi differenziative. *La zona corticale* è costituita da cellule epiteliali con ampio citoplasma e una rete complessa di protrusioni, dall'ampio nucleo vescicoloso spesso macro nucleolato. Tali cellule sono frammiste a timociti e a sparsi macrofagi.

La zona midollare è formata da una rete di cellule epiteliali di dimensioni ridotte con nucleo ovoidale o fusato, frammiste a numerosi linfociti B e cellule dendritiche interdigitate. Un presumibile aspetto differenziativo epidermoide delle cellule midollari è rappresentato dai corpuscoli di Hassal, formazioni cheratinizzanti, talvolta cistiche, tipiche della zona (figura 1). *Gli spazi perivascolari*, contenuti all'interno della capsula del timo sono assenti durante i primi anni di vita, ma diventano prominenti nell'invecchiamento e nell'involuzione dell'organo [12]. Il timo è un organo linfoide primario sede della linfopoiesi T; in esso avviene la maturazione dei linfociti T di derivazione midollare a linfociti T *naïf*, l'eliminazione dei linfociti T non funzionali e l'acquisizione della tolleranza *self* per la linea linfatica. I timociti percorrono l'organo con andamento cortico-midollare e in questo percorso vengono presentati a peptidi antigenici montati su molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MCH). In breve, il timo provvede all'eliminazione in una prima fase dei linfociti che hanno sviluppato recettori non funzionali per l'antigene (TCR), poi elimina quelli che hanno sviluppato un TCR ad alta affinità per l'antigene e potenzialmente autoreattivi.

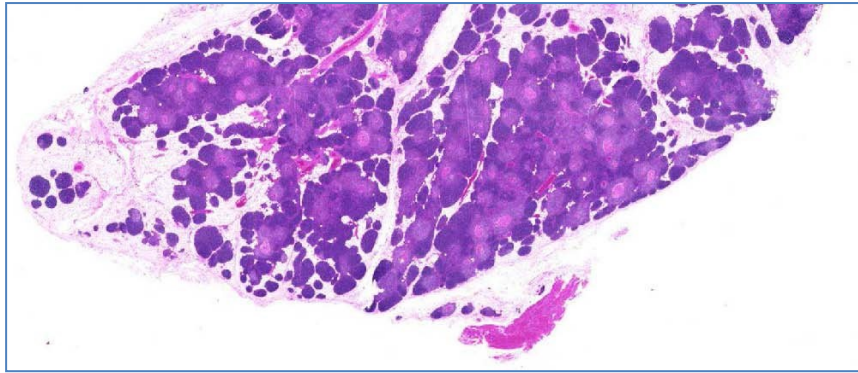


Figura 1: nel bambino l'organo presenta l'evidente alternanza delle aree corticali più scure e delle aree midollari più chiare.

2.3 Anatomia patologica nei TETs

I timomi sono neoplasie epiteliali del timo che originano da un processo di trasformazione neoplastica di cellule epiteliali timiche [13]. In generale, rientrano nella classificazione di tumori maligni poiché per ogni tipo istologico viene riscontrata la tendenza a recidivare o a metastatizzare [14]. I timomi hanno localizzazione nel mediastino anteriore, ma raramente possono svilupparsi a livello ectopico nella regione del collo, sulla superficie della pleura, all'ilo polmonare, in sede pericardica e diaframmatica. Si presentano generalmente di forma ovoidale e nodulare, con ampia variabilità di dimensione e peso, circondati da una capsula fibrosa e con deposizioni calcifiche in corrispondenza di setti divisorii tra i lobuli.

I primi criteri di classificazione risalenti agli anni '60 (Bernatz e colleghi 1961) si basavano su parametri descrittivi, sulla prevalenza del tipo cellulare (cellule fusate, linfociti o entrambi) o sulla morfologia cellulare (fusate, poligonali, miste). Tali caratteristiche, tuttavia, non sembravano rilevanti da un punto di vista prognostico [15].

Secondo lo schema proposto da Levigne, Rosai del 1978, i timomi venivano suddivisi in due forme:

- *timomi benigni*: interamente capsulati (60-80%) e citologicamente privi di caratteri atipici; dopo asportazione chirurgica possono recidivare nel 1-2%;
- *timomi maligni invasivi*: differiscono dai primi solo per i caratteri di invasività.

Questo schema di classificazione mostrava altresì alcune criticità, apparendo scarsamente rappresentativo della notevole eterogeneità morfologica dei tumori epiteliali timici.

La classificazione proposta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, risalente con la prima edizione al 1999, ha introdotto una distinzione in forme tumorali a basso grado di malignità (timomi) e forme ad alto grado di malignità (carcinomi timici). In base a tale classificazione, sono stati definiti tre tipi di timomi:

- *midollare* (tipo A);
- *corticale* (tipo B);
- *misto* (tipo AB).

Il timoma corticale, era a sua volta distinto in B1, B2, B3, in relazione all'entità della componente linfocitaria e al grado di atipia. Tale classificazione, basata sulla morfologia delle cellule tumorali epiteliali (poligonali o cellule a fuso), sulla relativa proporzione della componente linfocitaria non tumorale (decescente dal tipo B1 verso il B3) e la somiglianza con la struttura normale del timo, è stata confermata anche nella revisione del 2015 [16] e nell'ultima del 2021, nella quale sono stati riproposti tutti i criteri di classificazione precedentemente validati e ribadito l'imprescindibile ricorso ad un approccio interdisciplinare del "tumor board" per l'ambito dell'oncologia del mediastino fortemente promosso dal gruppo internazionale dei tumori timici (International Thymic Malignancy Interest Group (ITMIG) e volto al coinvolgimento di differenti figure specialistiche (radiologi, chirurghi toracici, oncologi). Ad integrazione della precedente revisione, nell'ambito dei timomi viene fatta menzione del timoma micronodulare con stroma linfoide e del timoma metaplastico, distinti da un punto di vista istologico e per il diverso contenuto di cellule T.

Nello specifico, il timoma A presenta una morfologia cellulare a fuso, che si diversifica dalla citologia rotondeggiante o ovoidale tipica delle forme B e C. Esiste anche una variante atipica del timoma A, che mostra ipercellularità, incrementata attività mitotica ed evidenza fenomeni necrotici (figura 2). Diversamente, il Tipo B è caratterizzato da una notevole bioreattività ed assume sembianze analoghe a quelle dell'organo del timo in fase fetale o infantile. Il sottotipo B1 è ricco in componente linfocitaria ed è presente un'architettura simil-timo, con una ricca componente di cellule T immature, aree di differenziazione midollare (le cosiddette isole midollari) e sparpagliate cellule epiteliali dendritiche di forma poligonale. Nel sottotipo B2, la componente epiteliale è rappresentata da sparpagliate cellule carnose, in cui risiede un nucleo vescicolato e un nucleolo distinto. Qui vengono osservate cellule poligonali a gruppi o singole o cellule dendritiche epiteliali mescolate con cellule T. Infine, il sottotipo B3 (detto anche sottotipo povero in linfociti) è rappresentato da cellule epiteliali dall'aspetto rotondo/poligonale. Si riscontra inoltre un blanda atipia. Ci sono foglietti di cellule epiteliali da leggermente poligonali a moderatamente atipiche con rari ponti intracellulari, sparse e non mescolate con cellule T [17].

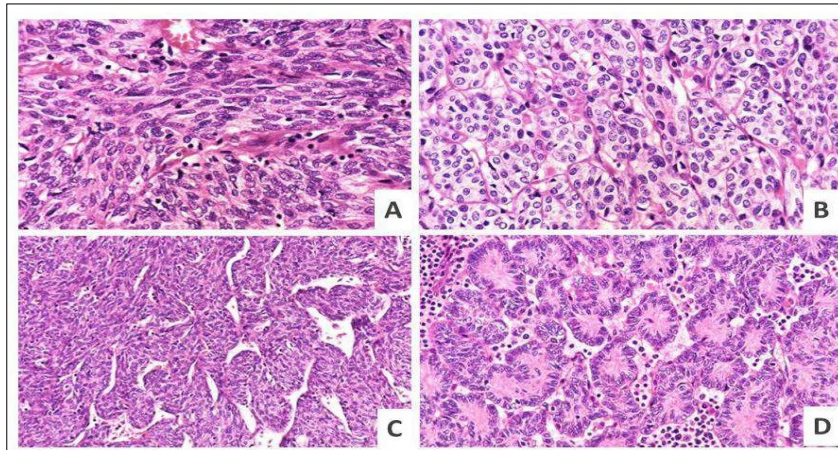


Figura 2: variabilità morfologica del timoma A. Le cellule epiteliali possono assumere morfologia fusata (A), poligonale (B), mantenendo una morfologia senza atipie e mitosi. La quota dei linfociti è scarsa. Raramente possono assumere morfologia di tipo glomerulare (C) o a formare rosette (D).

Il carcinoma timico è una neoplasia epiteliale del timo caratterizzata da un alto grado di atipia, da un comportamento invasivo e dalla mancanza di organizzazione istologica che ricordi il parenchima timico. Era stato definito nella prima classificazione WHO come timoma di tipo C; tale nomenclatura è stata poi abbandonata nelle successive revisioni. In riferimento alla classificazione proposta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) del 2015, e confermata nel 2021, i carcinomi timici vengono suddivisi in diversi sottotipi:

- squamocellulare (cheratinizzante e non cheratinizzante) (figura 3);
- basaloide;
- mucoepidermoide;
- simil-linfoepitelioma;
- sarcomatoide;
- a cellule chiare;
- adenocarcinoma
- NUT (nuclear protein in testis);
- Indifferenziato

La quinta e più recente classificazione proposta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità individua nell'ambito dei tumori epiteliali del timo anche i tumori neuroendocrini del timo [NETs], i tumori a cellule germinali del mediastino e neoplasmi mesenchimali [7] [18] [19].

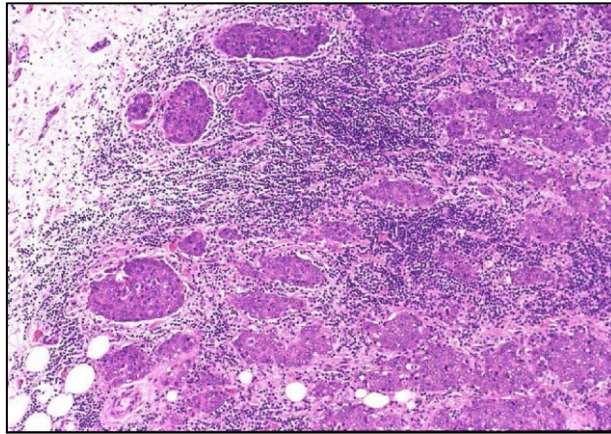


Figura 3: esempio di carcinoma squamocellulare non cheratinizzante.

Il grado di malignità dei diversi sottotipi di tumori epiteliali timici cresce nell'ordine: A, AB, B1, B2, B3 e carcinoma timico. I timomi A e AB manifestano tendenzialmente in comportamento come tumori benigni, il tipo B1 viene associato ad un tumore a basso grado di malignità (la sopravvivenza a 10 anni è del 90-95%), il tipo B2 con un grado superiore di malignità, e infine il tipo B3 in stadio avanzato è relato ad una prognosi negativa, analogamente al carcinoma timico e altri tumori maligni (la sopravvivenza a 5 anni è del 50-70% circa per i timomi B3 e solo del 30-50% per i carcinomi timici). In riferimento al carcinoma timico (neoplasia epiteliale timica più aggressiva e caratterizzata da una diffusione ematogena e linfatica) ed ai suoi rispettivi sottotipi, lo squamocellulare, il basaloide ed il muco epidermoide mostrano una prognosi migliore rispetto ad altri [1] [2] [7] [16] [18].

I TETs sono patologie estremamente eterogenee da un punto di vista biologico. Nell'ultima decade, l'implementazione delle tecnologie *high throughput* nei tumori solidi ha permesso di identificare un ampio spettro di aberrazioni molecolari e meccanismi di segnalazione alterati, portando ad una distinta definizione dei profili molecolari dei timomi rispetto ai carcinomi timici. Nonostante gli avanzamenti nella conoscenza nell'ambito della loro biologia, il potenziale oncogenico di queste patologie rimane tuttavia ancora ampiamente sconosciuto. Una più approfondita indagine a livello di biomarcatori potrebbe determinare un miglioramento cruciale nella gestione della malattia, agevolandone la diagnosi, stabilendo una corretta prognosi ed individuando la migliore strategia di trattamento [8].

L'immunoistochimica gioca un ruolo chiave nella classificazione dei tumori del timo. I TETs esprimono specifici marcatori epiteliali, in particolare citocheratine (CKs) ad alto peso molecolare. Si tratta di componenti citoscheletriche tipiche di cellule epiteliali normali del timo, dei timomi A e dei carcinomi timici. In queste cellule in particolare, è espressa la cheratina 19. La cheratina 20 è presente nel timo normale e nei timomi in generale. In aggiunta, ci sono

evidenze della proteina *p63*, membro della famiglia delle proteine p53 con funzione di fattori di trascrizione. Il fattore CD5 è un marcatore tipico delle cellule T immature del timo ed è espresso in più del 90% dei timomi, cellule T neoplastiche e nei carcinomi timici. CD20 è presente nelle cellule B normali e neoplastiche, nel 50% dei casi di Timoma A e circa nel 50% del Timoma di tipo AB. Infine, C-KIT e CD117 sono espresse circa nell'80% dei casi di carcinoma timico [17].

2.4 Patogenesi molecolare

La differenziata istologia dei tumori epiteliali del timo correla con una altrettanto ampia eterogeneità di profili biomolecolari e di vie di segnalazione annesse alla patogenesi di queste neoplasie.

La letteratura testimonia che il profilo mutazionale genomico dei TETs sia caratterizzato da un accumulo di mutazioni C>T a livello di isole CpG, condizione alla base del fenomeno dell'invecchiamento e in linea con l'età media in cui si ha l'esordio di malattia [8].

Uno studio rivela come, da analisi di sequenziamento effettuate su 117 campioni di TETs posti a confronto con un pari numero di tessuti normali, ricorra in questi tumori un set di 4 geni mutati: il fattore di trascrizione generale II-I (GTF2I), HRAS, TP53, and NRAS [20]. È interessante notare come i carcinomi timici presentino un maggior numero di mutazioni geniche rispetto ai timomi, tra cui si annoverano quelle a livello di ben noti geni correlati al cancro come tp53, CYLD (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A - CDKN2A), BRCA1-Associated Protein 1 (BAP1), e Polybromo 1 (PBRM1) [21].

In aggiunta, analisi di sequenziamento di un pannello di 409 geni effettuate in 12 campioni di carcinomi timici hanno portato all'identificazione di mutazioni in 24 geni, ivi incluso KIT, Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 2 (DDR2), Platelet-derived Growth Factor Receptor Alpha (PDGFRA), ROS1, Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R) [22].

Alterazioni del numero di copie cromosomiche (*Chromosomal copy Number Alterations*) sono frequenti nei TETs e solitamente sono associate ai sottotipi B2 e B3 dei timomi e ai carcinomi timici. Inoltre, è dimostrato che specifiche aberrazioni cromosomiche hanno una correlazione con l'istologia e la prognosi di questi tumori. Basti pensare, ad esempio, alla perdita del cromosoma 16q che è tipica dei carcinomi timici [20] o alla perdita di 6p23, in cui risiede il gene oncosoppressore FOXC1 (Forkhead box C1), che correla con una riduzione del tempo libero da progressione di malattia [23] [24].

Anche alterazioni epigenetiche, come metilazioni aberranti al DNA, vengono spesso osservate in associazione al sottotipo istologico ed allo stadio clinico. Tra le varie, alcuni fonti comprovano nei TETs il silenziamento di specifici geni oncosoppressori, ad esempio attraverso l'ipermetilazione del promotore del gene MLH1, la metilazione del gene dell'O-6-metilguanina DNA metiltrasferasi (MGMT) con la conseguente mancata espressione della proteina, la metilazione del promotore del gene per CDKN2 [23]. Nell'ambito dei meccanismi di regolazione epigenetica alla base dell'insorgenza della malattia, rientrano inoltre gli RNA non codificanti (Non-coding RNAs - ncRNAs) che risultano implicati nei processi di trascrizione genica e post trascrizionali. A conferma di ciò, Ganci ed i suoi collaboratori in uno studio del 2014 hanno identificato un pannello di 87 miRNAs differenzialmente espressi nei TETs rispetto ai tessuti sani. In particolare, è stata evidenziata una sovraregolazione di miRNAs dal potenziale oncogenico, come miR-21-5p e sottoespressione di miRNA oncosoppressori, come miR-145-5p; anche Melis e collaboratori, nel loro lavoro del 2021, affermano che la patogenesi di questi tumori trovi una giustificazione nei differenti profili di espressione di MicroRNA rispetto a tessuti sani, identificando specifici miRNA oncosoppressori la cui ridotta espressione è associata ad un aumento della proliferazione cellulare, della migrazione e dell'invasività con la conseguente metastatizzazione [10][25][26][107].

c-KIT risulta sovraespresso nel 79–88% dei casi di carcinomi timici, mentre mutazioni a carico del gene KIT vengono riscontrate in una percentuale minore del 10% dei casi, con un ampio spettro di mutazioni non spesso sensibili ad inibitori di KIT [18,24]. Un simile fenomeno si verifica per il gene HER2 (espresso nel 6% dei timomi e nel 47% dei carcinomi timici) [27].

Le alterazioni del pathway di PI3K/AKT/mTOR rappresentano un elemento cardine nella velocità di crescita del timoma [28]. Ad integrazione, in letteratura viene dimostrato che il recettore per il fattore di crescita epidermico (Epidermal Growth Factor Receptor - EGFR), fattore deputato allo sviluppo ed all'omeostasi del tessuto epiteliale, risulta spesso sovraespresso in cellule di timomi e carcinomi timici [1] [8] (nel 70% dei casi di Timomi e nel 53% dei carcinomi timici) con una significativa associazione tra maggiori livelli di espressione in fase avanzata di malattia (III-IV stadio). Il numero di copie del gene EGFR sembra essere amplificato in maniera più evidente nel timoma B3. Diversamente, l'accumulo di mutazioni puntiformi a carico del gene EGFR è raro nelle neoplasie del timo; non si registra, in effetti, una correlazione tra i livelli di espressione della proteina e lo status mutazionale del gene [1][8]. I tumori epiteliali del timo esprimono in aggiunta i recettori per le somatostatine (SSTR), dimostrando in tal senso una chiara implicazione con l'effetto anti-proliferativo di farmaci specifici per questo bersaglio molecolare [29] [30].

Negli ultimi anni, numerosi sforzi sono stati fatti per comprendere più approfonditamente i potenziali meccanismi e le caratteristiche biologiche dei TETs, anche attraverso il ricorso a tecniche di Next-generation sequencing (NGS). In tale direzione, sono state acquisite conoscenze in merito decine di biomarcatori associati ad inibitori dei meccanismi del checkpoint immunitario. Tra questi, sono stati identificati il *tumor mutation burden* (TMB), il *Programmed cell death-1* (PD-1) e il suo ligando (PD-L1) e il fattore *microsatellite instability/deficient mismatch repair* (MSI/dMMR). PD-L1 è comunemente espresso dai TETs, 23-92% dei timomi ed il 36–80% dei carcinomi timici [31].

Infine, come per molti altri tumori solidi, l'angiogenesi acquisisce un ruolo importante nei TETs: il fattore di crescita endoteliale vascolare (Vascular Endothelial Growth Factor - A, VEGF-A) ed i suoi recettori (VEGFR-1 e VEGFR-2) risultano implicati nel processo sia in condizioni fisiologiche che patologiche. In particolare, VEGF-A è stato proposto quale fattore pro-angiogenico e autocrino nei timomi e fattore immunoregolatorio nel timo. Sia il VEGF-A che i suoi recettori sono inoltre sovraespressi nei TETs e il loro livello di espressione sembra aumentare con l'avanzamento dello stadio di malattia [32]. Inoltre, numerose sono le fonti scientifiche attestanti la presenza di più elevate concentrazioni di VEGF e del fattore di crescita dei fibroblasti (b-Fibroblast Growth Factor) nei pazienti affetti da carcinoma timico, rispetto ai pazienti con timoma [33].

2.5 Diagnosi, stadiazione e prognosi

Nella maggior parte dei casi si ricorre all'imaging per individuare eventuali sintomi di estensione locale con i quali spesso esordiscono le neoplasie timiche. In altri casi invece la massa mediastinica viene diagnosticata durante una TC occasionale in assenza dei sintomi tipici. L'obiettivo della diagnosi radiologica è riconoscere la presenza del tumore e definire una stadiazione più veritiera possibile, al fine di intervenire con strategie terapeutiche appropriate. L'iter diagnostico inizia con una radiografia del torace, tuttavia, essendo le immagini radiografiche poco sensibili e poco specifiche, nei pazienti in cui viene identificata una massa mediastinica all'Rx sia in quelli con esame negativo ma con forte sospetto di timoma, va eseguito un esame TC, reputato oggi come la tecnica più precisa per la diagnosi primaria e per il follow-up dei TETs. La RMN viene indicata, ma solo in casi selezionati. La PET basata sull'uptake di FDG è stata valutata per la diagnosi dei TETs, ma rimane un'indagine di seconda scelta alla TC [34] [35] [36].

La diagnosi radiologica viene tendenzialmente associata a quella istopatologica condotta tramite:

- FNA biopsy (ago aspirato) eco-guidata o TC-guidata

- Core needle biopsy (ago biopsia) eco-guidata o TC-guidata
- Minitoracotomia. [37] [38]

La stadiazione dei tumori del timo si avvale di due sistemi ad oggi disponibili, ossia il sistema TNM (Tumor-Node-Metastasis) (International Association for the Study of Lung Cancer/International Thymic Malignancy Interest Group), che viene fortemente raccomandato e ritenuto lo standard, in accompagnamento al sistema di stadiazione Masaoka-Koga ancora utile in quanto il più a lungo impiegato e ampiamente in uso in molti studi clinici [39].

I tassi di sopravvivenza relativa (RS) nei pazienti ad un anno e 5 anni dalla diagnosi di TETs sono dell'85% e del 68%, rispettivamente. Ad ogni modo, esistono delle differenze tra le istologie di TETs con un RS a 5 anni intorno al 70% e al 37%, per timomi e carcinomi del timo rispettivamente [2] [40].

2.6 Strategie terapeutiche in uso e nuove prospettive di cura

Purtroppo a causa della rarità della malattia ne consegue mancanza di ampi studi randomizzati e l'impossibilità per lungo tempo di linee guida condivise per la gestione delle neoplasie timiche, dal momento della diagnosi e stadiazione alla scelta del più adeguato approccio terapeutico. Nel 2020, per la prima volta in Italia, grazie al prezioso lavoro di revisione della letteratura da parte di un panel multidisciplinare, unitamente a rappresentanti di associazioni di pazienti, sono state redatte delle raccomandazioni condivise per la gestione di tali neoplasie. Le stesse sono state formalmente approvate dall'Associazione Italiana in Oncologia Medica (AIOM) [39].

La comune pratica clinica prevede la chirurgia curativa a scopo radicale che rappresenta il primo step di trattamento nella stragrande maggioranza dei casi di TETs, eventualmente seguita, in casi selezionati, da combinazioni con chemioterapia/radioterapia (trattamenti post operatori).

In linea generale, la radicalità chirurgica è un fattore prognostico molto importante per il controllo delle recidive locali di malattia e la sopravvivenza del paziente. Trattamenti neoadiuvanti con lo scopo di ridurre le dimensioni del tumore per migliorare l'esito dell'intervento di asportazione possono incidere positivamente sulla sopravvivenza globale [8].

Se la lesione viene giudicata localmente avanzata o non resecabile, una chemioterapia di induzione può essere indicata a seguito di discussione in ambito multidisciplinare. La radioterapia post-operatoria viene considerata nei casi di timomi e carcinomi del timo con istologia aggressiva e con coinvolgimento extracapsulare oppure in caso di malattia residuale a livello microscopico o macroscopico (R1 e R2). In caso di malattia avanzata o metastatica, il principale approccio è quello che si basa su trattamenti palliativi a livello sistemico. La

chemioterapia a base di platino rimane ad oggi lo standard per la prima linea di trattamento in pazienti con TETs allo stadio avanzato o metastatico [39], che in particolare per le istologie di timoma A e B3 costituisce il più efficace approccio terapeutico in combinazione con le antracicline. I dati che emergono da una meta-analisi di studi clinici retrospettivi che comparavano l'efficacia del platino in combinazione con antracicline rispetto al solo platino, sia in timomi che in carcinomi del timo, mostrano tassi di risposta del 69,4% e del 37,8% rispettivamente nei timomi. Il beneficio dell'approccio in combinazione non si manifesta invece in maniera così evidente nei carcinomi timici, in cui i tassi di risposta sono simili (40.2% contro 41.2%) [1]. In un setting di pazienti in prima linea, un'altra combinazione che ha dimostrato di raggiungere un interessante tasso di risposta nei carcinomi timici allo stadio avanzato è la doppietta carboplatino e paclitaxel (21.7% CI 9.0-40.4%) [41] (36% CI 21-53%) [42].

Oltre alla chemioterapia, recenti significative acquisizioni nell'ambito delle alterazioni molecolari implicate nella patogenesi di questa malattia portano all'identificazione di nuovi potenziali bersagli molecolari e allo sviluppo di terapie target somministrabili in singolo o in combinazione con altri trattamenti sistemici (tra cui l'immunoterapia) come documentato da trial clinici ongoing. Su queste basi, l'efficacia di agenti target su pazienti con recidiva di TETs o refrattari alla semplice chemioterapia può rappresentare un approccio interessante [8] [39] [43] [44] [45] [46] [47] [48].

Alcuni dei principali pathways molecolari di riferimento per il trattamento dei tumori del timo sono quelli di EGFR (epidermal growth factor receptor), di KIT/SCFR (KIT/mast/stem-cell growth factor receptor) e di IGF-1R (Insulin-like Growth Factor-1 Receptor). Relativamente agli approcci anti-EGFR, ad oggi non ci sono evidenze che attestino risposte efficaci a trattamenti con inibitori tirosin-chinasici; mutazioni attivanti al gene EGFR sono altamente infrequenti nei TETs [49] [50]. Uno studio di fase II, esaminava i risultati derivanti dalla somministrazione di gefitinib in 26 pazienti pretrattati allo stadio IV di TETs, attestanti in effetti solo una risposta parziale [1] [51]. Questo dato è confermato da un secondo studio di fase II, che includeva 18 pazienti refrattari a chemioterapia e analizzava l'efficacia della somministrazione di erlotinib in combinazione con bevacizumab, farmaci anti-EGFR, senza riportare alcun dato interessante [52]. Un lavoro più recente mostra invece la prima evidenza clinica di efficacia legata a terapie anti-EGFR, riportando un caso di carcinoma timico squamocellulare avanzato recante una mutazione a carico dell'esone 20 del genere EGFR in cui veniva somministrato apatinib dopo più linee di chemio-radioterapia, sottolineando un vantaggio in risposta parziale dopo 5 mesi di trattamento (guadagno di 5 mesi in sopravvivenza globale e 10 mesi liberi da progressione di malattia) [53].

KIT è un recettore tirosin chinasi di tipo III espresso a livello della membrana cellulare che, attraverso una serie di reazioni di fosforilazione a cascata innescate dall'interazione con il suo ligando, regola i processi di proliferazione cellulare, differenziamento, adesione ed apoptosi [54]. Questa proteina è overespressa nei TETs, nello specifico con una percentuale del 73–86% di carcinoma timico, condizione che trova evidenze in letteratura: in effetti, l'efficacia clinica si registra nei casi di mutazioni a livello dell'esone 11 V560del, esone 14 H697Y, esone 17 D820E, esone 11 V559G, esone 11 577–579del, esone 11 Y553N e all'esone 13 K642E. Le mutazioni a livello degli esoni 11 V560 del, V559G, e Y553N sono sensibili al trattamento con imatinib, D820E, H697Y, K642E, e del 557–559 con sorafenib [55] [56].

Da uno studio di fase II condotto su pazienti con timoma allo stadio avanzato (32) e carcinoma del timo (19), non responsivi ad una precedente linea di chemioterapia a base di platino, si evince una risposta parziale a seguito di somministrazioni giornaliere di everolimus, un inibitore di mTOR, in 3 e 2 pazienti con timoma e carcinoma timico rispettivamente. La PFS mediana era di 16,6 mesi in caso di timoma e di 5,6 mesi di carcinoma del timo [28]. Alcuni studi puntano a testare inoltre l'efficacia di trattamenti con Octreotide, noto analogo di somatostatine, che ha elevata affinità per il recettore SST2 con conseguente effetto di riduzione sul livello di secrezione dell'ormone della crescita e di IGF-1 [57]. Altri trial di fase II prevedono la somministrazione di octreotide in singolo o in combinazione con prednisolone in caso di TETs allo stadio avanzato, che esprimono alti livelli di IGF-1R, registrando una risposta completa nel 5,3% e risposta parziale nel 25% dei pazienti con timoma arruolati. Diversamente, non si evince alcuna risposta in pazienti con carcinoma del timo [58] [59].

Negli ultimi anni, l'uso di immuno Checkpoint Inibitori (ICIs) ha rivoluzionato il trattamento e la prognosi di molte tipologie tumorali. Nuove conoscenze nell'ambito dell'immunoterapia sono state recentemente implementate, in particolare, anche nel trattamento dei tumori epiteliali timici. Come noto, tra i principali fattori predittivi di risposta a trattamenti con ICIs vi è un elevato livello di espressione di PD-L1. In riferimento ai TETs, l'overespressione di questa molecola spiega il razionale per l'impiego dell'immunoterapia per queste patologie, in particolare nel carcinoma del timo che può costituire il setting migliore per tali trattamenti, alla luce dei suoi più alti livelli di espressione di PD-L1 ed il suo elevato *tumor mutational burden*, fattore dal valore predittivo di risposta, unitamente ad un minor rischio di comparsa di sindromi paraneoplastiche ed eventi avversi immunorelati [20]. Attualmente, sono tre gli ICIs in fase di sperimentazione per i TETs: pembrolizumab (anticorpo anti-PD1 umanizzato IgG4 kappa), nivolumab (anticorpo anti-PD1 umano IgG4) e avelumab (anticorpo anti-PD-L1 umano IgG1). In particolare, il pembrolizumab è stato aggiunto come opzione terapeutica di II linea di trattamento nei pazienti

con carcinoma timico all'interno delle linee guida della National Cancer Comprehensive Network (NCCN) guidelines [39] [60]. Nonostante le potenzialità derivanti dagli approcci di immunoterapia, la comparsa di possibili eventi avversi immuno-relati (iAEs), quali i fenomeni di autoimmunità, spinge ad indagare maggiormente sulla via di segnalazione a valle dell'interazione PD-1/PD-L1, al fine di individuare sia quei pazienti che possano maggiormente beneficiare della terapia che quella categoria maggiormente a rischio di sviluppare reazioni con carattere di severità [61] [62] [63] [64].

2.6.1. Trattamenti anti-angiogenici ed in particolare anti-VEGFR

Il termine “*angiogenesi*” definisce l'espansione della rete vascolare tramite la formazione di ramificazioni da un vaso pre-esistente. Trattasi di un fenomeno complesso che viene stimolato da parte di diversi fattori pro-angiogenetici. Nel tumore, è un processo che consiste nella formazione di nuovi vasi all'interno e intorno alla lesione ed è governato da diversi fattori di crescita, come il *VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)* il *PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)*, il *FGR (Fibroblast Growth Factor)*, il $TGF\beta$ (Transforming Growth Factor- β) e le angiopoietine. In particolare, la famiglia dei VEGF include VEGF-A, -B, -C, -D, e -E ed il fattore di crescita placentare (PIGF). Fra questi, il VEGF-A è il più caratterizzato ed è un fattore di crescita chiave, con diverse varianti di splicing (VEGF-A125, VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-A183, VEGF-A189, VEGF-A206) [65]. I vasi tumorali generati sono solitamente immaturi e difettosi, conseguentemente inducono condizioni di ipossia, una diminuzione dell'infiltrazione di componenti cellulari immunitarie e pertanto un incrementato rischio di disseminazione di cellule cancerose con una maggiore tendenza all'invasione e metastatizzazione a distanza. Come risultante, l'efficacia di trattamenti farmacologici viene inficiata [66] [67].

Tra i vari tumori solidi, l'espressione dei fattori di crescita vascolare e dei rispettivi recettori è stata ampiamente osservata anche nei TETs, con una correlazione tra maggiori livelli di espressione e gli istotipi più aggressivi [1] [8] [68]. Elevate concentrazioni sieriche di VEGF e del fattore di crescita dei fibroblasti (Fibroblast Growth Factor, b-FGF) sono state, in effetti, rilevate in pazienti affetti da carcinoma del timo. Alla base, si creano condizioni d'ipossia che determinano una forte up-regulation dell'espressione del VEGF-A tramite l'aumentata attività del fattore indotto dall'ipossia HIF (Hypoxia Inducible factor): in tal caso lo stesso non lega il rispettivo VHL (proteina di von Hippel-Lindau), componente del complesso ubiquitina-ligasi, non viene degradato e quindi si accumula attivando una serie di meccanismi a cascata che portano all'amplificazione dell'attività trascrizionale del gene VEGF-A.

Sebbene VEGF e VEGFR siano overespressi nei TETs e sia documentata la loro implicazione nello sviluppo della patologia, esistono pochi dati a disposizione relativi all'efficacia derivante dalla somministrazione di inibitori dell'angiogenesi in questi tumori [1]. In effetti, numerosi farmaci anti-angiogenetici sono già entrati nella pratica clinica per il trattamento di altre neoplasie, altri sono in fase di sperimentazione. *Bevacizumab*, anticorpo monoclonale anti-VEGF, è stato sperimentato in uno studio di fase II in combinazione con erlotinib che ha arruolato 18 pazienti con timoma ricorrente (11) e con carcinoma timico (7). Non sono state evidenziate risposte oggettive, poiché è risultata stabilità di malattia per il 60% dei pazienti, mentre il restante 40% è andato in progressione [8].

Tra i vari, lo studio ongoing RELEVANT è volto a valutare l'efficacia di trattamenti anti-angiogenetici con *ramucirumab*, anticorpo monoclonale che lega il dominio extracellulare di VEGFR2 e già approvato per il trattamento di altre neoplasie in associazione ai taxani, in un setting di pazienti con carcinoma del timo e timoma B3 in prima linea di trattamento in combinazione con carboplatino e paclitaxel [50] [69].

In aggiunta, gli inibitori tirosin-chinasici *sunitinib* (inibitore multitarget anche con azione contro VEGFR) e *sorafenib* hanno dimostrato una certa efficacia in seconda e successive linee di trattamento per il timoma B3 e in modo più importante nel carcinoma del timo [32][33] [39][68] [69] [70] [71].

Tra le classi di terapie target con effetto anti-angiogenetico ad oggi note nei TETs, *lenvatinib* è associato ad una maggiore attività antitumorale, specie in pazienti affetti da carcinoma del timo, e rappresenta un'opzione di trattamento valida ed esplorabile [39], come dimostrato dai promettenti dati dello studio REMORA a cui hanno partecipato pazienti con carcinoma del timo metastatico o allo stadio avanzato non resecabile in progressione di malattia dopo chemioterapia a base di platino [50]. In Giappone, il farmaco ha ottenuto l'approvazione ed è entrato in pratica clinica per il trattamento di tumori del timo avanzati e refrattari [9].

2.6.2 Biomarcatori dal ruolo prognostico e predittivo di risposta a terapie anti-angiogenetiche

Polimorfismi a Singolo Nucleotide

Nonostante gli avanzamenti nell'ambito biologico e la scoperta di numerose aberrazioni geniche implicate nel processo di carcinogenesi delle neoplasie epiteliali del timo, le conoscenze attuali relative all'assetto biomolecolare di questi tumori sono ancora limitate. Un'approfondita caratterizzazione si rivela necessaria per mettere a punto trattamenti soddisfacenti per queste malattie così eterogenee, partendo dall'identificazione di nuovi fattori

dal potenziale prognostico o in grado di predire la risposta a trattamenti, in particolare anti-angiogenetici.

Su queste basi, la ricerca di mutazioni geniche con ruolo driver e un estensivo sequenziamento del genoma sono stati condotti nell'intento di interferire con le principali vie di segnalazione alla base della crescita e della proliferazione tumorale [72].

Tra le varie, l'angiogenesi gioca un ruolo importante nell'oncogenesi e VEGF-A ed i suoi recettori sono direttamente implicati in questo processo. Nell'uomo, il gene codificante per VEGF-A è situato a livello del cromosoma 6 (6p21.1), mentre quello del recettore VEGFR2 o di KDR (kinase insert domain receptor) è localizzato nel cromosoma 4 (4q11-q12). Un'importante caratteristica di tali geni è rappresentata dall'elevato tasso mutazionale all'interno della popolazione e numerosi Polimorfismi a Singolo Nucleotide (SNPs) sono stati identificati [73].

I polimorfismi di singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism, SNPs) consistono nella sostituzione di una singola base e costituiscono la forma più comune di variazione del genoma umano, comparando nella popolazione con una frequenza allelica >1% e con una densità di 1 ogni 1000 basi (bp) [74]. Pur essendo prevalentemente "silenti", nei casi in cui ricadano in regioni codificanti del DNA, possono determinare una variazione fenotipica e produrre alterazioni funzionali. L'analisi degli effetti funzionali degli SNPs nella ricerca oncologica ha molteplici implicazioni, sia cliniche che biologiche, tanto da spingere i ricercatori ad investigare sul loro possibile ruolo rispetto alla suscettibilità ad alcuni tumori (fattori di rischio), al comportamento biologico (fattori prognostici) e alla risposta terapeutica (fattori predittivi), nell'ottica di fornire validi elementi su cui impostare attività prevenzione e approcci anti-tumorali sempre più specifici e mirati [75].

Alcuni studi hanno dimostrato come tali polimorfismi possano contribuire alla variabilità nell'espressione di VEGF-A tra i tessuti ed influenzare le concentrazioni della proteina nel plasma, focalizzandosi inoltre su una possibile correlazione con l'incremento dell'aggressività o un peggiore *outcome* nei pazienti con TETs [1] [32] [68]. Da tali motivazioni, nasce l'interesse nello studio di Polimorfismi a Singolo Nucleotide a carico di geni che regolano l'angiogenesi in queste neoplasie in relazione ai vari outcome clinici [69].

microRNA non-codificanti (miRNAs)

Una linea di ricerca in campo oncologico di attuale interesse è quella che si focalizza su meccanismi di regolazione epigenetica, in particolare attraverso microRNA non-codificanti (miRNAs) che, unitamente a specifiche mutazioni geniche, sono implicati nell'insorgenza e

nella progressione tumorale [76] [77] [78]. I miRNA sono piccole molecole di RNA non codificanti in grado di controllare l'espressione genica a livello post-trascrizionale legandosi con un tratto di 7-8 nucleotidi nella regione 3'-non codificante dei loro trascritti target. Possono fungere sia da oncogeni che da oncosoppressori in funzione dei geni bersaglio o del tipo di tumore [79] [80]. MiRNA e pathways di regolazione epigenetica sembrano inoltre creare un complesso circuito con cui modulano o reprimono enzimi chiave per il controllo del rimodellamento cromatinico [81], inducendo il conseguente silenziamento dell'espressione mediato da interazioni a livello del promotore genico o del trascritto nascente [82].

Sebbene, l'epigenetica rappresenti ad oggi un ambito parzialmente inesplorato in relazione alla biologia dei TETs, anche queste neoplasie sembrano essere in qualche modo correlate a questi meccanismi, mostrando aberrazioni epigenetiche diverse a seconda dell'istotipo tumorale [23] [83] [84] [85] [86] [87]. In questo scenario, il ruolo dei miRNA come possibili biomarcatori non-invasivi per diagnosi, prognosi e risposta alle terapie già noto per altre patologie tumorali, negli ultimi anni sta acquisendo significato nei TETs: interessanti sono i risultati di due studi condotti da Bellissimo e collaboratori del 2016 e 2017 attestanti un profilo di espressione differenziale di queste molecole in campioni di plasma prelevati da soggetti malati rispetto a donatori sani, con l'individuazione di specifici onco-miRNAs sovraespressi nei primi e down-regolati nei secondi. Diversi livelli di miRNA circolanti sono stati anche rilevati in relazione alla fase di trattamento, dal confronto tra campioni di pazienti con TETs raccolti al momento dell'intervento chirurgico rispetto al follow-up [7] [10].

2.7 Il miglioramento della gestione dei TETs: l'importanza dell'approccio multidisciplinare e la nascita della rete TYME

La rarità e la complessità dei tumori epiteliali del timo hanno da sempre costituito un ostacolo alla definizione di robuste raccomandazioni diagnostiche, stadialive e terapeutiche, in quanto la quasi totalità delle casistiche si è basata fino a poche decine di anni fa su serie unicentriche o oligocentriche o su trial non randomizzati e retrospettivi. Negli ultimi 20 anni si è assistito ad un progressivo aumento dell'interesse per i TETs con la creazione di gruppi di lavoro locali, nazionali o sovranazionali che hanno raccolto le casistiche dei centri affiliati, consentendo la realizzazione di database e registri inizialmente basati su dati retrospettivi e più recentemente su dati prospettici. Attraverso piattaforme online, è stato così possibile generare una quantità di informazioni di gran lunga maggiore rispetto al passato e di produrre un avanzamento epocale nelle conoscenze cliniche, patologiche e terapeutiche dei TETs altrimenti impossibili da

ottenere attraverso contributi monocentrici o di pochi centri. Oltre alle difficoltà annesse alla rarità delle neoplasie epiteliali del timo, la complessità di tali patologie ha rimandato ad una gestione multidisciplinare per l'individuazione di un adeguato percorso di terapie. Per la prima volta in Italia nel 2020, grazie al prezioso contributo di un gruppo di diversi specialisti che includeva anatomopatologi, chirurghi toracici, radioterapisti, oncologi e neurologi, afferenti a centri d'eccellenza nell'ambito del trattamento dei TETs, unitamente a rappresentanti di associazioni di pazienti, sono state redatte delle raccomandazioni condivise per la presa in carico multidisciplinare di pazienti affetti da tali neoplasie, che descrivono le corrette modalità di diagnosi e stadiazione, i nuovi trattamenti sistemici a disposizione, come le terapie a bersaglio molecolare ed approcci di immunoterapia. Queste raccomandazioni sono state approvate dall'Associazione Italiana in Oncologia Medica (in accordo con le linee guida definite dall'European Society of Medical Oncology) e rese fruibili alla popolazione (<https://www.aiom.it/raccomandazioni-2020-su-tumori-epiteliali-del-timo-tet/>) [39].

Su queste premesse, dal 2014 è istituito in Italia il network TYME (ThYmic MalignancEs) cui partecipano centri d'eccellenza nazionali con esperienza nella diagnosi e cura delle neoplasie timiche e di cui fa parte la Clinica Oncologica del Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari, Università Politecnica delle Marche - Ospedali Riuniti di Ancona. Il network opera in stretta connessione ed integrazione con specialisti ed associazioni di pazienti (*Tu.To.R - Tumori Toracici Rari*) provenienti dall'intero territorio italiano per offrire un supporto concreto ed i migliori strumenti di diagnosi e terapie (www.tyme.eu) [2].

3. Pazienti e metodi

Il progetto è stato suddiviso in due fasi, la prima delle quali ha previsto lo svolgimento di analisi retrospettive su fattori dell'angiogenesi che costituiscono l'oggetto principale del presente studio. Tali dati hanno trovato seguito, nella seconda fase, con la conduzione di uno studio prospettico che si pone l'obiettivo di definire il ruolo prognostico di fattori clinici e biologici per i pazienti affetti da TETs, con terapia antiangiogenetica.

3.1. Studio retrospettivo:

3.1.1 Analisi della casistica dei pazienti

È stata eseguita l'analisi delle caratteristiche cliniche su una casistica dei pazienti con neoplasie timiche (timoma e carcinoma timico) afferenti alla Clinica Oncologica dell'Università Politecnica delle Marche - Azienda Ospedaliero Universitaria "Umberto I - G.M. Lancisi - G. Salesi" di Ancona tra il 1993 al 2012, arruolati nel rispetto dei criteri di eleggibilità allo studio:

Criteri di inclusione:

- Età maggiore di 18 anni
- Diagnosi citologica o istologica di timoma o carcinoma timico
- ECOG Performance Status ≤ 2
- Consenso informato scritto del paziente per effettuare le terapie prescritte per il trattamento

Criteri di esclusione:

- Gravidanza e allattamento
- Malattie preesistenti o concomitanti controindicanti l'esecuzione di terapie antitumorali

Di ogni paziente sono stati raccolti:

- Dati anagrafici (sesso, data di nascita).
- Storia clinica
 - Neoplasie maligne precedenti
 - Malattie associate all'esordio quali Miastenia Gravis (MG), eritroblastopenia acquisita (Pure Red Cell Aplasia, PRCA) ipogammaglobulinemia e altre malattie autoimmuni.
 - Valutazione di severità della MG, se presente all'esordio, secondo la classificazione MGFA (Myasthenia Gravis Foundation of America)
 - Performance status secondo Karnovsky Performance Status-ECOG
- Diagnosi patologica

- Tecnica di prelievo di materiale patologico
- Diagnosi patologica definitiva (timoma o carcinoma timico)
- Istotipo del timoma secondo la classificazione WHO del 2004
- Istotipo del carcinoma timico secondo la classificazione WHO del 2004
- Dimensione del tumore primitivo, considerando il diametro maggiore minore o maggiore di 5 cm
- Infiltrazione microscopica della capsula tumorale e delle strutture adiacenti
- Stadiazione
 - Stadiazione clinica pre-chirurgica secondo il sistema Masaoka - Koga
 - Stadiazione patologica secondo il sistema Masaoka – Koga
 - Stato dei margini (R0, R1, R2)
- Trattamento chirurgico
 - Accesso chirurgico (sternotomia mediana, toracotomia, VATS, VATS-robot, approccio trans-cervicale, sternotomia trasversa, emisternotomia trasversa, sternotomia e toracotomia, sternotomia e split sternale)
 - Radicalità dell'intervento (resezione completa o incompleta)
 - Ampiezza della timectomia (totale o parziale)
 - Ulteriori strutture resecate a causa di infiltrazioni o metastasi
- Radioterapia
 - Intento (neoadiuvante, adiuante, palliativo)
 - Dose erogata (cGrey)
 - Periodo di trattamento
 - Risposta
- Chemioterapia
 - Intento (neoadiuvante, adiuante, palliativo)
 - Protocollo farmacologico
 - Numero di cicli
 - Periodo di trattamento
 - Risposta
- Follow-up
 - Evoluzione della MG se presente all'esordio
 - Vital status al 2012
 - Causa di morte
 - Recidive di malattia, diagnosi e trattamento

- Neoplasie maligne successive e loro trattamento

La risposta alla terapia è stata valutata sulla base dei criteri RECIST 1.1 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors).

3.1.2 Analisi degli SNPs

Lo studio ha preso in considerazione come possibili fattori prognostici e predittivi:

- due polimorfismi di VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A): rs2010963, rs699947;
- due polimorfismi di VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2): rs2305948 e rs1870377;
- due polimorfismi di VEGFR-3 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3): rs307821 e rs307826;
- un polimorfismo di PDGFR- α (Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha): rs35597368;
- otto polimorfismi di HIF1- α (Hypoxia Inducible Factor-1, subunità alpha): rs2057482, rs1951795, rs2301113, rs10873142, rs11158358, rs12434438, rs11549465, rs11549467.

Per la selezione dei polimorfismi a singolo nucleotide a carico di ogni singolo gene è stato utilizzato il software Pupasuit (<http://pupasuite.bioinfo.cipf.es/index.jsf> - version 2.0.0, bionifo 2008), il CIPF Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP) creato dal National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>), e dalla letteratura, utilizzando i seguenti criteri:

1. frequenza allelica > 10% nella popolazione caucasica
2. rilevanza clinica desunta da studi precedenti in altre neoplasie (trattandosi del primo di studio a riguardo nelle neoplasie timiche)
3. i polimorfismi in posizione tale da alterare l'espressione del gene interessato (come la regione del promotore o in 3' UTR)

In sintesi, sono stati selezionati SNPs che verosimilmente determinano un effetto a livello dell'espressione della proteina e della sua funzione biologica.

Lo studio degli SNPs è stato effettuato sul DNA purificato dal tessuto tumorale incluso in paraffina (FFPE: *Formaldehyde- or Paraformaldehyde-fixed Paraffin-Embedded*) per 53

campioni, mentre per gli altri 4 il DNA è stato estratto da campioni di sangue periferico. Il materiale genetico è stato poi analizzato con il metodo della *Real Time* PCR.

Purificazione del DNA da tessuto tumorale incluso in paraffina

(FFPE: Formaldehyde- or Paraformaldehyde-fixed Paraffin-Embedded)

Le sezioni di tessuto tumorale dai pezzi operatori dei pazienti inclusi nello studio sono state preparate in collaborazione con l'Anatomia Patologica dell'Università Politecnica delle Marche.

Per l'estrazione e la purificazione del DNA da tessuto è stato utilizzato il kit *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation* che prevede dei lavaggi in serie con xilene ed etanolo per eliminare la paraffina. A seguire, i campioni vengono sottoposti a digestione con proteasi ed infine il DNA è purificato utilizzando un filtro a fibra di vetro.

Estrazione di DNA da sangue periferico

Il DNA genomico è stato estratto dal sangue mediante il kit "*Flexigene 3 ml Blood*", secondo il relativo protocollo. Sono state preparate *falcon* da 15 ml, ognuna delle quali etichettata col numero identificativo del paziente, in cui sono stati aliquotati 2 ml di sangue e 5 ml del *buffer* di lisi FG1.

Ad ogni campione, centrifugato per 5 min. a 2000xg, è stato rimosso il sovrnatante e aggiunto 1ml di buffer FG2 e 10µl di proteasi. Ogni provetta, subito agitata al *vortex* fino ad ottenere una soluzione omogenea, è stata posta in un *thermo block* a 65° C per 10 min. Attraverso il netto viraggio del colore della miscela contenente il campione, da rosso a verde oliva, è stato possibile monitorare la digestione della proteasi. Successivamente, è stato aggiunto 1 ml di isopropanolo al 100% alla soluzione, miscelata per inversione, fino alla comparsa della "medusa" di DNA.

Ogni campione è stato centrifugato a 2000xg per 3 min. ed è stato poi scaricato il sovrnatante.

Infine il DNA è stato lavato con 1 ml di etanolo al 70 % e centrifugato a 2000xg per 3 min. Dopo l'eliminazione del sovrnatante, la *falcon* è stata capovolta su di un foglio di carta assorbente, per far evaporare la porzione di alcool.

Successivamente il DNA è stato risospeso in 300 µl del *buffer* di eluizione FG3 (10 mM Tris-HCl, pH 8.5).

Real Time PCR

La *Real Time* PCR, definita anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (q-PCR), è una particolare reazione a catena della polimerasi (PCR), durante la quale avviene la simultanea amplificazione e quantizzazione del DNA o RNA. Comunemente, la metodica di quantificazione include l'utilizzo di colorazioni fluorescenti che si intercalano con il DNA a doppio-filamento (SYBER GREEN) o l'impiego di sonde fluorescenti che ibridano il DNA bersaglio (metodo più accurato ed affidabile).

La tecnologia usata per lo studio è stata la *TaqMan SNP Genotyping Assays (Life Technologies)* che consiste in:

- Due primer per amplificare la sequenza di interesse;
- Due sonde MGB *TaqMan* per distinguere tra i due alleli: una sonda marcata al 5' col *reporter dye* VIC che discrimina per l'allele 1. L'altra marcata al 5' col *reporter dye* FAM che discrimina per l'allele 2.

Il segnale di fluorescenza generato dall'amplificazione PCR ha fornito l'indicazione del tipo di allele presente nel campione. Qualora vi fosse la rilevazione unica del segnale del VIC, l'indicazione fornita dallo strumento è stata quella dell'omozigosi per l'allele 1. Diversamente, quando rilevata solo la fluorescenza emessa dal FAM, il campione ha fornito l'indicazione di omozigosi per l'allele 2; infine, l'eterozigosi è stata riscontrata in corrispondenza di una combinazione dei due segnali.

I parametri termici della reazione prevedevano un'iniziale step attivazione della Taq polimerasi a 95°C per 10 minuti, a cui seguivano 40 cicli di denaturazione del DNA (a 95°C per 15 secondi) e *annealing*/estensione (a 60°C per un minuto).

La miscela di reazione (dal volume finale di 25 µl) prevedeva i seguenti reagenti:

- 12.50 µl di 2X TaqMan Genotyping Master mix;
- 1.25 µl di sonda TaqMan SNP Genotyping Assay specifica per ogni SNPs studiato;
- 9.25 µl H₂O RNAsi-free;
- 2 µl di campione a concentrazione 5ng/µL (per un totale di 10 ng totali di DNA),

La piastra di PCR costituita da 96 pozzetti è stata inserita nello strumento Real-Time PCR 7300 Applied Biosystems in grado di rilevare direttamente il segnale di reazione. Lo strumento ha la capacità di captare lo spettro di emissione del campione durante l'intera reazione ed elaborare una rappresentazione della cinetica di reazione in tempo reale, a partire dalla variazione di fluorescenza per poi dare un segnale di output grafico a sua volta analizzato da un algoritmo specifico in grado di produrre tre cluster allelici rappresentanti le componenti genotipiche: omozigote per l'allele 1, omozigote per l'allele 2 ed eterozigote.

Analisi statistica

Le curve di sopravvivenza sono state elaborate utilizzando il metodo di Kaplan-Meier e le differenze nella probabilità di sopravvivenza sono state valutate con il Log-Rank test. Il livello di significatività statistica è stato fissato a 0,05. La sopravvivenza globale (Overall Survival) è stata definita come intervallo di tempo tra la data dell'intervento chirurgico e la morte o la data dell'ultima visita di follow-up.

L'analisi è stata condotta utilizzando il software MedCalc versione 11.4.4.0 (MedCalc Software, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke, Belgium).

3.2 Studio prospettico

3.2.1 Disegno dello studio e pazienti

Trattasi di studio multicentrico di fase II in aperto volto a valutare l'efficacia e la sicurezza del trattamento con ramucirumab (10 mg/kg) in combinazione con carboplatino (AUC5) e paclitaxel (200 mg/m²) in prima linea in pazienti con carcinoma timico o timoma B3 con aree di carcinoma in stadio localmente avanzato o metastatico.

I centri partecipanti allo studio sono i seguenti:

- Istituto Nazionale dei Tumori di Milano (Coordinatore)
- Istituto Clinico Humanitas di Rozzano
- Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana
- Clinica Oncologica Ospedali Riuniti - UNIVPM di Ancona
- Azienda Ospedaliero Universitaria Federico II di Napoli
- Istituto Oncologico Veneto di Padova

Criteri di Inclusione:

- Diagnosi di carcinoma del timo e timoma B3 con aree di carcinoma con malattia metastatica o ricaduto non pre-trattato. Prevista revisione centralizzata dell'istologia durante lo screening dei pazienti in laboratorio
- Consenso informato firmato e datato
- Età >18 anni
- Disponibilità di materiale istologico di archivio
- Raccolta di sangue e plasma al baseline e dopo la prima rivalutazione di malattia

- Presenza di malattia misurabile secondo i criteri Recist 1.1 (almeno una lesione misurabile e almeno ≥ 10 mm in una dimensione per una lesione non nodale e linfonodo positivo ≥ 15 mm)
- ECOG performance status 0 o 1
- Funzione midollare adeguata (come segue):
 - Neutrofili $\geq 1,500/\mu\text{L}$
 - Emoglobina ≥ 9 g / dl
 - Piastrine $\geq 100,000/\mu\text{L}$
- Coagulazione nella norma:
 - INR (Rapporto Internazionale Normale) $\leq 1,5$
 - PTT (tempo di tromboplastina parziale) ≤ 5 secondi al di sotto dell'ULN (Limite Superiore della Normalità). I pazienti che ricevono warfarina possono essere ammessi al trattamento con eparina a basso peso molecolare.
- Funzionalità epatica adeguata:
 - Bilirubina totale $\leq 1,5$ volte ULN (eccezion fatta per quei pazienti affetti dalla syndrome di Gilbert che possono solo essere inclusi nel caso di valori di bilirubina $< 3,0 \times \text{ULN}$ o bilirubina diretta $< 1.5 \times \text{ULN}$ e aspartate transaminasi (AST) e alanine transaminasi (ALT) ≤ 3.0 volte ULN (o 5.0 volte ULN nel setting di metastasi epatiche)
- Adeguata funzionalità renale definita come creatinina sierica ≤ 1.5 volte l'ULN, o clearance della creatinina (misurata mediante raccolta di urina in 24 ore) ≥ 40 mL/minuto
- Donne fertili con consenso all'impiego di metodi contraccettivi per un periodo di 30 giorni oltre al tempo richiesto per la somministrazione del farmaco in accordo con le tempistiche dello studio
- Test di gravidanza negativo (per donne in età fertile)
- Maschi sessualmente attivi con una donna potenzialmente fertile in accordo per il ricorso a metodi contraccettivi per un periodo di 90 giorni oltre al tempo richiesto per la somministrazione del farmaco sperimentale secondo le tempistiche previste dallo studio
- Ammessa radioterapia ad intento curativo, purchè interrotta almeno 28 giorni prima dell'inizio del trattamento sperimentale. In caso di radioterapia palliativa, deve essere interrotta almeno 7 giorni prima. In caso di radioterapia all'encefalo, vanno previsti almeno 14 giorni tra la fine della stessa e l'inizio del trattamento sperimentale

Criteri di esclusione:

- Precedente terapia per carcinoma timico/timoma B3 con aree di carcinoma allo stadio localmente avanzato o metastatico
- Presenza di metastasi al Sistema Nervoso Centrale non trattate. In presenza di metastasi cerebrali, la radioterapia o chirurgia sono ammesse il paziente è clinicamente stabile, il trattamento con steroidi deve essere terminato almeno 2 settimane prima dell'inizio della terapia sperimentale oppure somministrati dopo resezione chirurgica dovrebbero essere sospesi almeno 28 giorni prima dell'inizio del trattamento
- Episodi di tromboembolia nei 3 mesi precedenti la prima somministrazione del trattamento sperimentale
- Neuropatia periferica di grado pari o superiore a 2 sec. Secondo i CTC AE v4.0 (Criteri per la Terminologia Comune per gli Eventi Avversi)
- Episodi di emottisi due mesi prima dell'inizio del trattamento
- Evidenza radiologica di cavitazione intratumorale
- Turbe della coagulazione congenite
- Diagnosi di:
 - Cirrosi epatica della classe B di Child-Pugh B (o peggiore) o cirrosi di ogni grado e storia di encefalopatia epatica o ascite clinicamente significativa risultante da cirrosi, quest'ultima definite come ascite da cirrosi durante diuresis o paracentesi
- Insufficienza cardiaca congestizia rilevante (NYHA II-IV) o aritmia cardiaca sintomatica o scarsamente controllata;
- Ogni altro evento tromboembolico, incluso infarto del miocardio, attacco ischemico transiente, danno cerebrovascolare, angina instabile, entro i 6 mesi antecedente la prima dose di terapia sperimentale
- Ogni evento tromboembolico arterioso, incluso ma non limitato l'infarto del miocardio, transiente attacco ischemico, problema cerebrovascolare, angina instabile, nei 6 mesi antecedenti l'inizio della terapia sperimentale. .
- Ipertensione incontrollata o scarsamente controllata (>160 mmHg sistolica o > 100 mmHg diastolica per almeno 4 settimane) nonostante gli standard per la gestione medica;
- Ferita, ulcera o frattura ossea grave o non guarita entro 28 giorni prima dell'inizio del trattamento;
- Disturbi emorragici significativi, vasculite o sanguinamento gastrointestinale (GI) di grado 3/4 nei 3 mesi precedenti l'inizio del trattamento

- Storia di perforazione gastroenterica e/o fistula entro i 6 mesi antecedenti l'inizio del trattamento;
- Ostruzione intestinale, anamnesi o presenza di enteropatia infiammatoria o resezione intestinale estesa, morbo di Crohn, colite ulcerosa o diarrea cronica Fratture ossee serie entro i 28 giorni precedenti l'inizio del trattamento
- Storia clinica di infezione nota da HIV, precedenti malattie oncologiche, eccetto tumori solidi senza evidenza di ripresa di malattia ricaduta entro i 3 anni antecedenti il trattamento sperimentale. Sono contemplati tumori in situ asal o tumore della pelle squalocellulare e/o carcinoma della cervice uterine in situ.
- Disordini metabolici incontrollati o altre patologie ad organi o sistemiche non maligne o effetti secondari al tumore che inducono alto rischio clinico o mettono a repentaglio la vita
- Altre condizioni psichiatriche acute o croniche o anomalie di laboratorio che possono aumentare il rischio associato alla partecipazione allo studio o alla somministrazione del farmaco in studio e, a giudizio dello sperimentatore, renderebbero il paziente non idoneo per l'ingresso in questo studio.
- Terzo spazio di ritenzione di liquidi (ad es. ascite o versamento pleurico), che richiede un drenaggio ripetuto
- Reazioni allergiche note o ipersensibilità a ognuno dei componenti del trattamento
- Stato di gravidanza
- Intervento chirurgico importante nei 28 giorni precedenti la prima dose del protocollo
- Intervento chirurgico previsto nel periodo di arruolamento nel trial
- Altra terapia antitumorale constestuale

Terapia antiplastrinica cronica, inclusa aspirina (ammessa dose giornaliera di 325 mg)

L'endpoint primario dello studio è la valutazione dell'efficacia della combinazione ramucirumab, carboplatino e paclitaxel in soggetti con carcinoma del timo non trattato o timoma B3 con aree di carcinoma attraverso la valutazione radiologica sec. criteri RECIST 1.1.

Endpoint secondari sono:

-la PFS (sopravvivenza libera da progressione) definita come il tempo che intercorre dall'inizio del trattamento e la data della prima comparsa di progressione o morte per ogni causa (la progressione viene valutata radiologicamente secondo i criteri RECIST 1.1);

-la sopravvivenza globale (OS) definita come il tempo tra l'inizio del trattamento e la morte per ogni causa;

-il tasso di eventi avversi in accordo con i criteri del National Cancer Institute CTCAE versione 4.0.

Il numero di pazienti previsti dallo studio per l'esecuzione delle analisi è pari a 60, con un'analisi ad interim dopo 30 pazienti. È prevista l'interruzione dello studio se i pazienti responsivi al trattamento sperimentale sono ≤ 4 . In caso contrario, è prevista l'estensione dell'arruolamento fino a 60 pazienti.

3.2.2 Analisi traslazionali previste dallo studio e metodiche di laboratorio

In considerazione della limitata conoscenza nell'ambito di potenziali biomarcatori correlati con l'attività di farmaci antiangiogenetici, in particolare con ramucirumab, sono previste analisi di ricerca traslazionale su:

-Blocchetti di tessuto paraffinati di tumore primitivo o di lesione metastatica per attività di sequenziamento mediante metodica NGS.

-campioni ematici per polimorfismi su estratti antecedenti l'inizio del trattamento.

-campioni ematici per pool di miRNA circolanti con valore prognostico e predittivo di risposta a trattamento con farmaco anti-angiogenetico da plasma estratto a specifici time points in studio. Quest'ultima analisi verrà condotta c/o la Clinica Oncologica del Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari dell'Università Politecnica delle Marche – AOU Ospedali Riuniti di Ancona.

Il progetto prevede una prima fase di screening mediante analisi di espressione differenziale con metodica *miRNAsequencing*, confrontando i campioni raccolti al baseline, prima di qualunque terapia sistemica (tempo t0), e dopo 6 settimane dall'inizio del trattamento (tempo t1), prelevati da pazienti in corso di trattamento. Questa analisi è prevista su una prima casistica di 30 pazienti per un totale di 60 campioni plasmatici ottenuti.

Lo step successivo, prevede una validazione dei miRNA significativi individuati nella fase precedente su una casistica più ampia (estendendola a tutti i 60 pazienti previsti dal protocollo) mediante lo strumento 7300 Real-Time PCR Applied Biosystems della ditta ThermoFisher. Queste analisi verranno effettuate presso il Laboratorio di Genetica Oncologica della Clinica Oncologica dell'Università Politecnica delle Marche - Ospedali Riuniti di Ancona.

Processazione dei campioni di sangue e recupero frazione plasmatica

Per l'esecuzione di analisi dei miRNA è prevista in primo luogo la raccolta e la processazione dei campioni di sangue da cui separare la frazione plasmatica, nella seguente

modalità: le provette vengono delicatamente invertite per per 8-10 volte. I campioni vengono successivamente centrifugati a 1.100xg per 20 minuti a temperatura ambiente. La frazione plasmatica può essere a questo punto prelevata mediante una pipetta pasteur monouso RNasi-free e trasferita in un tubo da 15 mL, in cui viene miscelata. Aliquote di 1 mL di plasma vengono trasferite in provette da 2mL e sottoposte a centrifuga a 10.000xg per 7 minuti a 4°C. La frazione plasmatica viene a questo punto trasferita in nuove provette da 1.5mL/2mL non disturbando il pellet formatosi. Le stesse vengono stoccate nel congelatore - 80°.

Estrazione di miRNA da campioni di plasma

L'estrazione dei miRNA dai campioni di plasma di pazienti arruolati prevede l'impiego del kit *miRNeasy Serum/Plasma Advanced (217204)* della ditta *Qiagen*.

Dopo aver preparato i campioni di plasma, la metodica prevede il trasferimento di 200 µl degli stessi in un tubo di 2 ml da inserire nella microcentrifuga. Successivamente, è prevista l'aggiunta di 60 µl di buffer RPL e una vortexata di durata superiore ai 5 secondi cui segue una fase di mantenimento a temperatura ambiente per 3 minuti. A questo punto, viene aggiunto 1 µl di mix *spike-in* (Unisp2, 4, 5), cui segue l'aggiunta di 20 uL di Buffer RPP. Il campione viene successivamente vortexato vigorosamente per 20 secondi e incubato a temperatura ambiente per 3 minuti. Lo stesso va poi centrifugato a 12.000xg per 3 minuti a temperatura ambiente per determinare la precipitazione del pellet. Il sovrinatante dovrebbe essere chiaro o incolore. Viene poi trasferito il sovrinatante (circa 230 uL) in un nuovo tubo per microcentrifuga e aggiunto 1 volume di isopropanolo per vortexare la miscela. Successivamente il campione viene trasferito alla RNeasy UCP MinElute spin column e centrifugato a 8000 xg per 15 secondi. Vengono aggiunti 700uL Buffer RWT alla colonna e si effettua una centrifuga per 15 secondi a ≥ 8000 xg. Ora, vanno aggiunti 500uL Buffer RPE all'interno della colonna e viene effettuato un'ulteriore centrifuga per altri 15 secondi a ≥ 8000 xg. Vengono aggiunti 500uL di etanolo all'80% alla colonna e viene eseguita una centrifuga per 2 minuti a ≥ 8000 xg ($\geq 10,000$ rpm) per lavare la membrana della colonnina. Viene rimossa la colonna dal tubo di raccolta senza alcun contatto con il liquido di scarto. La colonnina va posizionata in un nuovo tubo da 2 ml. Una volta aperto il coperchio della colonnina e centrifugato alla massima velocità per 5 minuti, deve essere rimosso il tubo di raccolta. La colonnina viene posta in una provetta da 1,5 ml a cui vengono aggiunti 20 µl di acqua RNasi free direttamente dal centro della membrana della colonnina. È prevista un'eluizione con almeno 10uL di acqua e un'incubazione di 1 minuto. La centrifuga va

chiusa e il campione va centrifugato per 1 minuto alla massima velocità. Il campione può essere infine sturato in frigorifero a -80°.

Analisi dei miRNA in Real-Time PCR

Per la fase di validazione dei miRNA è previsto l'utilizzo del kit miRCURY® LNA® miRNA SYBR® Green PCR per biofluidi, il cui procedimento si basa su due step principali: una retrotrascrizione universale ed un'amplificazione PCR basata sul SYBR Green e primer ad LNA.

La tecnica dovrà essere ottimizzata una volta ottenuti i primi risultati derivanti dal miRNA sequencing.

Il kit prevede un sistema miRNA-specifico che si avvale di un sistema basato sulla LNA e studiato per una rilevazione di miRNA molto sensibile ed accurata mediante una real-time PCR che usa SYBR® Green. La metodica è basata su una retrotrascrizione universale (RT), seguita da una amplificazione mediante realtime PCR con primer potenziato con LNA (Lucked Nucleic Acids).

La miscela di reazione 2x miRCURY SYBR Green contiene la QuantiNova DNA Polimerasi, inattiva a temperatura ambiente. Il protocollo della PCR va iniziato dopo un primo step di incubazione a 95° per attivare l'enzima.

Prima di iniziare, tale miscela va fatta scongelare, poi vortexata e brevemente centrifugata. In tabella 1, ne vengono riportati composizione e volumi:

Component	Serum/Plasma Focus PCR Panel	
	192 assays (in 96-well or 384-well plate format)	
2x miRCURY SYBR® Green Master Mix	1000 µl	
ROX Reference Dye (ABI instruments only)	100 µl/10 µl*	
cDNA template (undiluted)	20 µl	
RNase-free water	980 µl*	
Total reaction volume	2000 µl	

* Use ROX Reference Dye as a 20x concentrate for cyclers requiring a high ROX dye concentration (i.e., ABI PRISM 7000, Applied Biosystems 7300, 7900 and StepOne Real-Time PCR Systems) and as a 200x concentrate for cyclers requiring a low ROX dye concentration (i.e., Applied Biosystems 7500, ViiA 7 and QuantStudio Real-Time PCR Systems). Adjust the amount of RNase-free water accordingly.

Tabella 1. Mix di reazione miRCURY LNA Human Serum/Plasma Focus PCR Panels.

Il protocollo prevede:

- Vortexare la miscela di reazione vigorosamente e dispensarne 10 µl per pozzetto, poi mantenere la piastra protetta da luce a temperatura di 2–8°C per almeno 24 ore.

- Sigillare la piastra e centrifugarla brevemente a temperatura ambiente. Attendere 5 minuti per far sì che i primers possano completamente dissolversi nella mix di reazione.
- Impostare i cicli della real-time in accordo con la tabella 2 e dare avvio al programma:

Step	Time	Temperature	Ramp rate
PCR initial heat activation	2 min	95°C	Maximal/fast mode
2-step cycling			
Denaturation	10 s	95°C	Maximal/fast mode
Combined annealing/extension	60 s	56°C	Maximal/fast mode
Number of cycles	40*		
Melting curve analysis		60–95°C	

* If using a Roche LightCycler 480, use 45 cycles.

Tabella 2: Condizioni per i cicli PCR.

- Dare avvio alle analisi dei dati di amplificazione impiegando il software annesso allo strumento di PCR.

4. Risultati

4.1 Studio retrospettivo

Sono stati inclusi nello studio 78 pazienti, di cui 60 affetti da timomi e 18 da carcinomi timici. Il 47% dei soggetti è di sesso maschile (37) e il restante 53% femminile (41). L'età mediana della diagnosi era 63 anni (range 27-81). Le caratteristiche cliniche analizzate sono illustrate nella tabella 3.

Nel setting di pazienti sono stati ricercati eventuali quadri di Miastenia che è risultata presente in 19 pazienti (24%) ed in particolare, di questi 17 erano timomi e 2 carcinomi. La maggior parte di questi mostravano un quadro di grado lieve/moderato secondo i criteri della Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA).

A seguito dell'analisi, è emerso un caso di Lichen Ruber Planus associato a timoma, un quadro di sindrome della testa cadente associato a miosite in un altro caso di timoma; in un paziente con carcinoma timico si evidenziava invece una condizione di pancitopenia e anemia emolitica Coombs-positiva. Infine, uno dei pazienti con timoma mostrava una condizione di iperparatiroidismo primitivo e tiroidite di Hashimoto.

Nell'ambito del carcinoma timico, un paziente presentava ipergammaglobulinemia e altri due uno stato di immunodeficienza esordito come candidosi esofagea o riaccensione di Herpes Zoster Virus.

CARATTERISTICHE GENERALI (78 pazienti)	
SESSO	
Maschi	37 (47%)
Femmine	41 (53%)
MALATTIA	
Timoma	60 (77%)
Carcinoma timico	18 (23%)
PERFORMANCE STATUS ALL'ESORDIO	
0	50 (64%)
1	19 (24%)
2	9 (12%)
ETÀ DELLA DIAGNOSI	
Mediana (range)	63 (27-81)
MALATTIE AUTOIMMUNI ALL'ESORDIO	
Nessuna	55 (71%)
Miastenia Gravis	19 (24%)
Altre	4 (5%)

Tabella 3. Caratteristiche cliniche del campione analizzato.

Il 55% (43) dei tumori primitivi presentava un diametro maggiore superiore a 5 cm alla diagnosi, mentre per l'8% (6) dei pazienti non vi sono dati relativi alle dimensioni della lesione. Le caratteristiche riguardanti sesso, performance status e miastenia non hanno evidenziato alcun impatto sulla prognosi. Dall'analisi della sopravvivenza sono emerse, invece, differenze statisticamente significative rispetto alle dimensioni del tumore primitivo e il tipo di tumore, timoma o carcinoma timico (figura 4, a e b).

In particolare, confrontando i due istotipi è risultato che i pazienti affetti da timoma hanno avuto una prognosi significativamente migliore ($p=0,0114$) rispetto a quelli affetti da carcinoma timico.

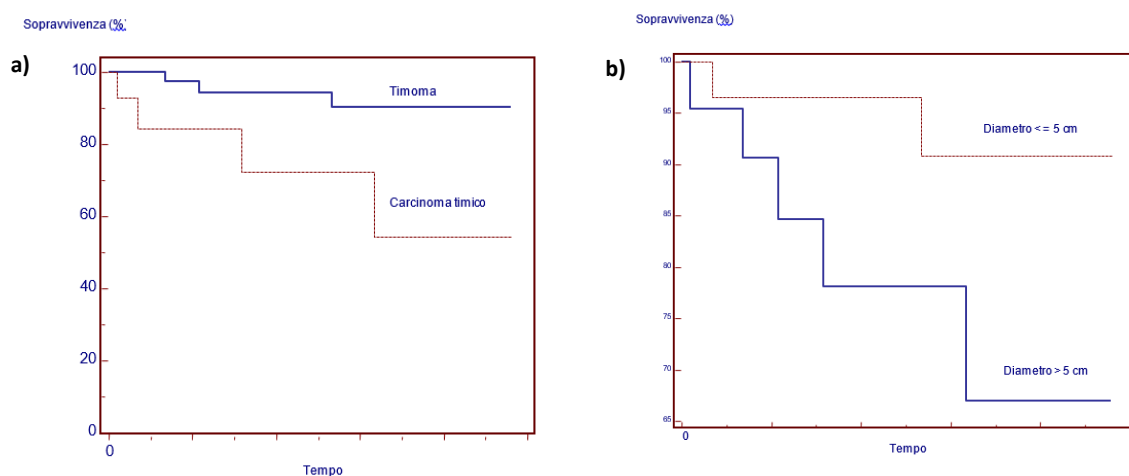


Figura 4: a) Curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier sul totale dei pazienti suddivisi in base all'istotipo tumorale (timoma e carcinoma timico; b) curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier nel totale dei pazienti suddivisi in base alle dimensioni del tumore primitivo.

In un campione di 57 pazienti, sono stati analizzati gli SNPs dei seguenti geni correlati all'angiogenesi:

- VEGF-A: rs2010963, rs699947;
- VEGFR-2: rs2305948 e rs1870377;
- VEGFR-3: rs307821 e rs307826;
- PDGFR- α : rs35597368;
- HIF1- α : rs2057482, rs1951795, rs2301113, rs10873142, rs11158358, rs12434438, rs11549465, rs11549467.

Dei suddetti polimorfismi sono stati valutati singolarmente aplotipo e frequenza allelica (tabella 4 e tabella 5).

	VEGFR-2		VEGF-A		VEGFR-3		PDGFR- α
	rs2305948 C>T	rs1870377 T>A	rs2010963 G>C	rs699947 C>A	rs307821 C>A	rs307826 T>C	rs35597368 T>C
Freq Gen1	82.5%	52.6%	39.3%	40.3%	78.2%	73.7%	89.5%
Freq Gen2	0%	3.5%	16.1%	15.8%	1.8%	3.5%	0%
Freq Etero	17.5%	43.9%	44.6%	43.9%	20%	22.8%	10.5%
N Gen1	47	30	22	23	43	42	51
N Gen2	0	2	9	9	1	2	0
N etero	10	25	25	25	11	13	6
Tot assegnati	57	57	56	57	55	57	57
Tot analizzati	57	57	56	57	55	57	57
Freq All.1	91.2%	74.6%	61.6%	62.3%	88.2%	85.1%	94.7%
Freq All.2	8.8%	25.4%	38.4%	37.7%	11.8%	14.9%	5.3%
N All1	104	85	69	71	97	97	108
Nall2	10	29	43	43	13	17	6

Tabella 4: Frequenze alleliche degli SNPs di VEGF-A, VEGFR-2, VEGFR-3, e PDGFR- α

	HIF1- α							
	rs2057482 C>T	rs1951795 C>A	rs2301113 A>C	rs10873142 T>C	rs11158358 C>G	rs12434438 A>G	rs11549465 C>T	rs11549467 G>A
FreqGen1	59.7%	47.4%	48.2%	49.1%	54.4%	43.9%	71.9%	100%
FreqGen2	3.5%	8.8%	8.9%	9.1%	3.5%	10.5%	1.8%	0%
Freq Etero	36.8%	46.9%	42.9%	41.8%	42.1%	45.6%	26.3%	0%
N Gen1	34	27	27	27	31	25	41	57
N Gen2	2	5	5	5	6	6	1	0
N etero	21	24	24	23	26	26	15	0
Tot assegnati	57	57	56	55	57	57	57	57
Tot analizzati	57	57	56	55	57	57	57	57
Freq All.1	78.1%	69.3%	69.6%	70%	75.4%	66.7%	85.1%	100%
Freq All.2	21.9%	30.1%	30.4%	30%	24.6%	33.3%	14.9%	0%
N All1	89	79	78	77	86	76	97	114
Nall2	25	35	34	33	28	38	17	0

Tabella 5: Frequenze alleliche degli SNPs di HIF-1 α .

L'analisi statistica degli SNPs del gene VEGF-A non ha mostrato risultati statisticamente significativi; relativamente al polimorfismo rs1870377 del gene VEGFR-2 è emerso che il genotipo omozigote A risulta essere significativamente correlato ($p < 0.05$) ad una sopravvivenza maggiore rispetto ai genotipi eterozigote T/A e omozigote T (figura 5).

In merito al polimorfismo rs307826 di VEGFR-3, l'analisi ha dimostrato che il genotipo omozigote C è significativamente correlato ad una prognosi migliore rispetto ai genotipi

eterozigote T/C e omozigote T (figura 6). La valutazione del polimorfismo rs35597368 di PDGFR- α rivela che il genotipo eterozigote T/C è significativamente correlato ad una sopravvivenza maggiore rispetto al genotipo omozigote T (figura7).

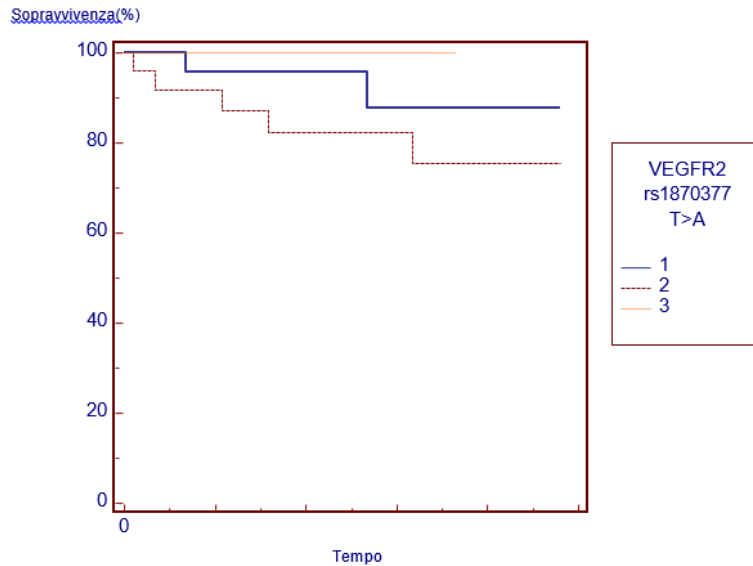


Figura 5: Curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier sul totale dei pazienti suddivisi in base al polimorfismo rs1870377 di VEGFR-2 (GRUPPO1=T, GRUPPO2=T/A, GRUPPO3=A). La mediana di sopravvivenza non è stata raggiunta.

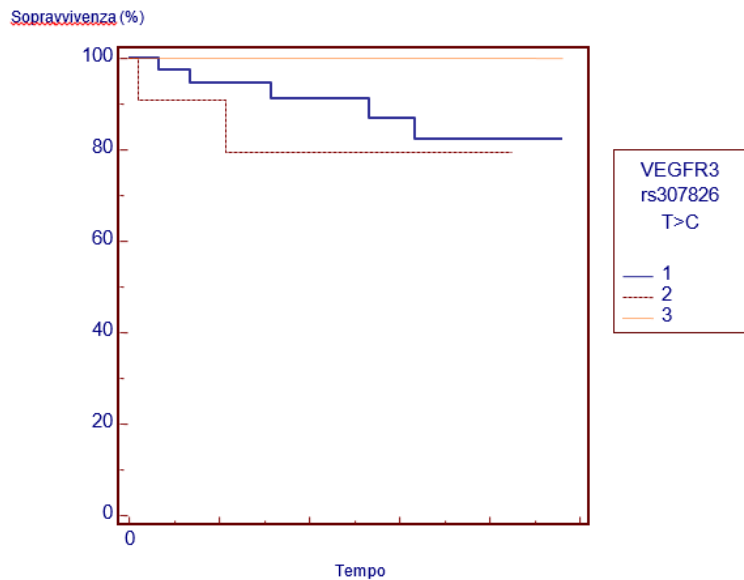


Figura 6: Curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier sul totale dei pazienti suddivisi in base al polimorfismo rs307826 di VEGFR-3 (GRUPPO1=T, GRUPPO 2=T/C, GRUPPO3=C). La mediana di sopravvivenza non è stata raggiunta.

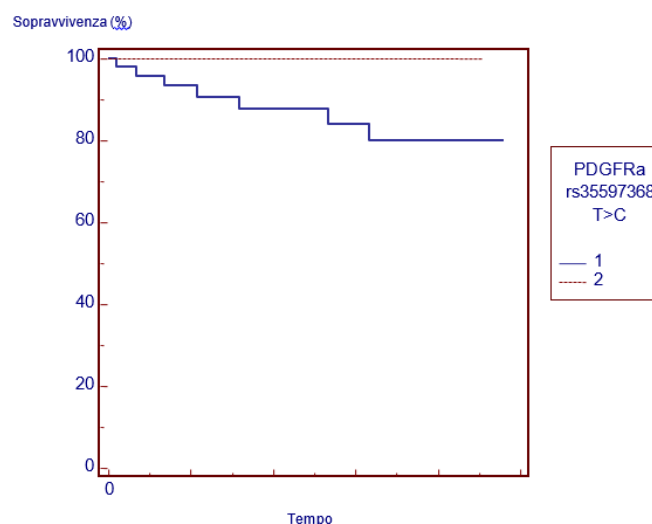


Figura 7: Curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier sul totale dei pazienti suddivisi in base al polimorfismo di PDGFR- α rs35597368 (GRUPPO1=T, GRUPPO2=T/C). La mediana di sopravvivenza non è stata raggiunta.

Cinque polimorfismi di HIF-1 α sono stati associati ad un aumento dell'overall survival: rs1951795 C, rs2301113 C, rs10873142 T/C, rs11158358 G/ C e rs2057482 C/T. L'analisi del polimorfismo rs230113 di HIF1- α ha evidenziato che il genotipo omozigote C risulta essere significativamente correlato ad una sopravvivenza maggiore rispetto ai genotipi eterozigote A/C e omozigote A.

Lo studio di rs1951795 di HIF1- α ha dimostrato che il genotipo omozigote C abbia correlazione significativa con una prognosi migliore rispetto ai genotipi eterozigote C/A e omozigote A.

L'analisi del polimorfismo rs10873142 di HIF1- α ha rilevato che il genotipo eterozigote T/C risulta essere significativamente correlato ad una sopravvivenza maggiore rispetto ai genotipi omozigote C e omozigote T. In merito al polimorfismo rs11158358 di HIF1- α , lo studio ha dimostrato che il genotipo eterozigote G/C abbia correlazione significativa con una sopravvivenza maggiore se confrontato con i genotipi omozigoti G e C.

Infine la valutazione di rs2057482 di HIF1- α ha rilevato che il genotipo eterozigote C/T sembra correlato significativamente con una sopravvivenza maggiore rispetto ai genotipi omozigoti C e T. In entrambi gli studi la mediana di sopravvivenza non è stata raggiunta (figura 8, a, b, c).

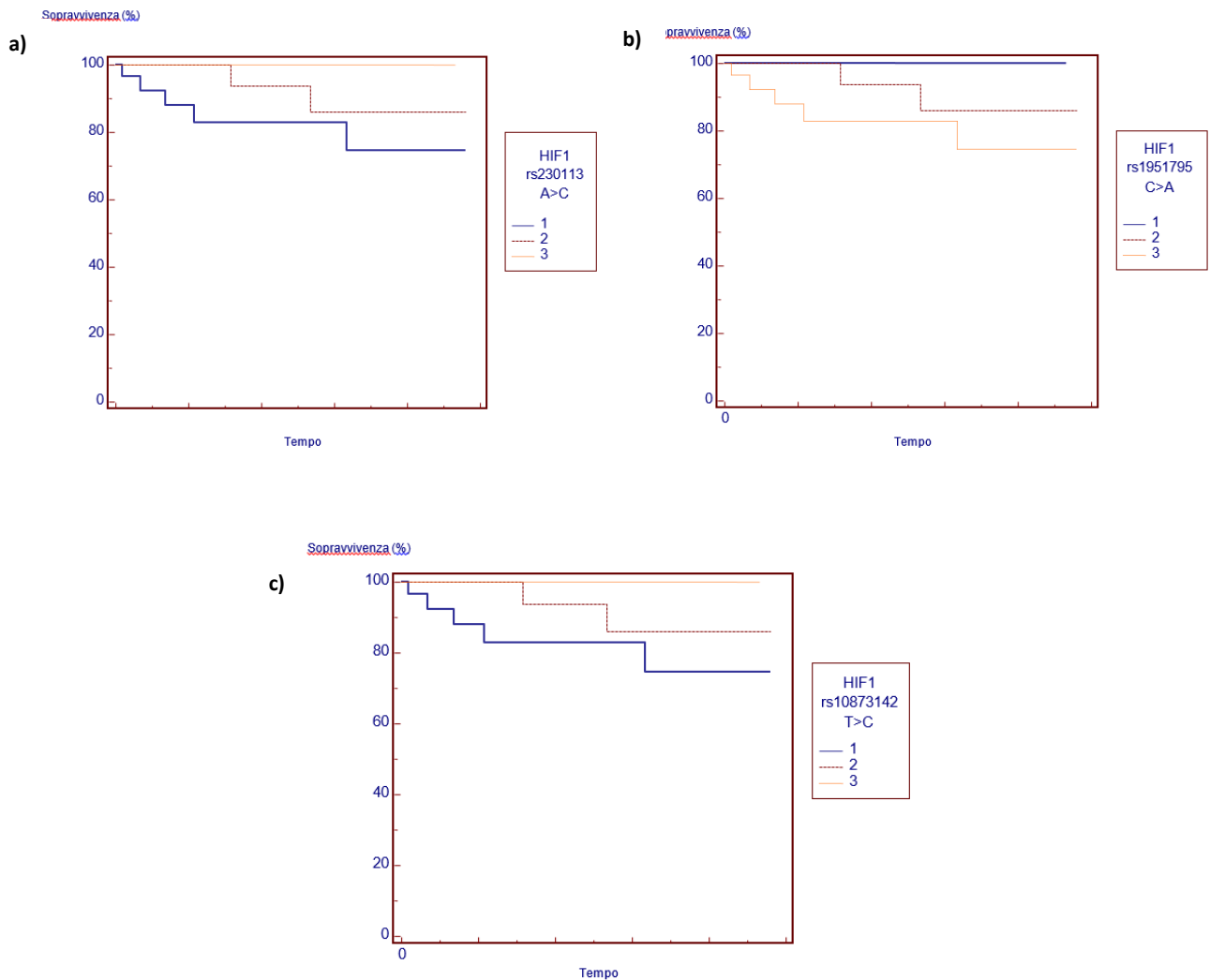


Figura 8: a) curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier sul totale dei pazienti suddivisi in base al polimorfismo rs230113 di HIF1- α (GRUPPO1=A, GRUPPO2=A/C, GRUPPO3=C). La mediana di sopravvivenza non è stata raggiunta; b) curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier sul totale dei pazienti suddivisi in base al polimorfismo rs1951795 di HIF1- α (GRUPPO1=C, GRUPPO2=C/A, GRUPPO3=A). La mediana di sopravvivenza non è stata raggiunta; c) curva di sopravvivenza di Kaplan-Meier sul totale dei pazienti suddivisi in base al polimorfismo rs10873142 di HIF1- α (GRUPPO1=T, GRUPPO2=C, GRUPPO3=T/C). La mediana di sopravvivenza non è stata raggiunta.

4.2 Studio prospettico

Le neoplasie epiteliali del timo sono patologie rare ed estremamente eterogenee da un punto di vista biologico. La diversa risposta ai trattamenti è legata alla differente istologia e, nonostante gli avanzamenti delle conoscenze nell'ambito della biologia, maggiori sforzi vengono richiesti per lo sviluppo di approcci farmacologici efficaci a bersaglio molecolare, basate sull'individuazione di nuovi potenziali biomarcatori dal possibile ruolo prognostico e/predittivo di risposta alle terapie (in particolare antiangiogenetiche).

Su queste basi, da una collaborazione nata con altri centri italiani esperti nella gestione dei TETs, è stato elaborato il protocollo clinico in esame, definendo i criteri di inclusione ed esclusione per l'arruolamento e le tecniche di laboratorio per la ricerca traslazionale previste.

Lo studio ha ottenuto l'autorizzazione da parte di AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) e successivamente è stato acquisito parere favorevole per l'avvio della sperimentazione clinica da parte dei Comitati Etici locali dei centri coinvolti, tra cui il C.E.R.M. (Comitato Etico della Regione Marche). Lo studio è stato avviato localmente con determina autorizzativa dell'A.O.U. Ospedali Riuniti di Ancona a maggio 2019 (nota n.450/DG del 30.05.19). Nel mese di novembre 2019 si è svolta la visita di inizio dello studio presso la Clinica Oncologica dell'Università Politecnica delle Marche - Azienda Ospedaliero Universitaria Ospedali Riuniti Umberto I - G.M. Lancisi - G. Salesi di Ancona ed è stato avviato l'arruolamento dei pazienti con la raccolta dei consensi informati.

Nel mese di aprile 2021, lo studio ha subito un emendamento sostanziale in quanto è stato modificato il ruolo del Principal Investigator del centro coordinatore. Il Comitato Etico locale (C.E.R.M.) ha recepito ed autorizzato l'emendamento stesso, unitamente all'aggiornamento dell'elenco dei centri coinvolti nello studio, nella seduta del 29 luglio 2021.

Nel nostro centro sono stati screenati 5 pazienti e ad oggi arruolati 4. Nella tabella 6, sono riportati i dati clinici dei pazienti arruolati.

CENTRO	N. SCREENING	ETA'	SESSO	DIAGNOSI	STADIO DI MALATTIA ALL'ESORDIO Sec TNM e sec Masaoka Koga	CHEMIOTERAPIA PREOPERATORIA	CHIRURGIA	RADIOTERAPIA POST-OPERATORIA	STADIO DI MALATTIA INGRESSO IN STUDIO Sec TNM e sec Masaoka Koga	METASTASI EPATICHE	METASTASI POLMONARI	METASTASI OSSEE
0007-	0007-001	67	MASCHIO	CARCINOMA TIMICO SQUAMOSO	STADIO IV	NO	NO	NO	STADIO IV	SI'	SI'	SI'
0007-	0007-002	62	MASCHIO	CARCINOMA TIMICO SQUAMOSO	STADIO IV	SI'	SI'	SI'	STADIO IV	NO	SI'	NO
0007-	0007-004	51	FEMMINA	CARCINOMA TIMICO	STADIO IV	NO	NO	NO	STADIO IV	NO	NO	NO
0007-	0007-005	71	MASCHIO	CARCINOMA TIMICO	STADIO IV	SI'	SI'	SI'	STADIO IV	no	SI'	SI'

Tabella 6: dati clinici dei pazienti arruolati nello studio afferenti al nostro centro.

Dei 4 pazienti arruolati, il 100% presenta un'accertata diagnosi di carcinoma timico. 3 soggetti sono di sesso maschile e 1 femminile. L'età media è di 63 anni (range 51-71). Tutti i soggetti si presentano all'ingresso nello studio con uno stadio IV di malattia. Due pazienti sono stati sottoposti ad intervento chirurgico precedentemente all'adesione al protocollo, a chemioterapia preoperatoria e a trattamento radioterapeutico di tipo palliativo. I polmoni rappresentano la sede

più colpita da secondarismi di carcinoma timico (3 casi su 4), cui seguono ossa e fegato. Un paziente presenta metastasi epatiche; metastasi polmonari sono riscontrate in 3 soggetti su 4. In accordo con quanto previsto dal disegno sperimentale, sono stati raccolti e processati i campioni plasmatici dei suddetti pazienti al tempo t0 prima di qualunque terapia sistemica (baseline) e al t1 (alla prima rivalutazione radiologica dopo 6 settimane dall'inizio del trattamento con farmaco anti-angiogenico) e conservati insieme a 28 campioni di plasma recentemente spediti da altro centro coinvolto nello studio. In tabella 7, sono indicati i campioni biologici ad oggi conservati presso il nostro laboratorio.

	RANDOMIZATION NUMBER	DATA PRELIEVO BASELINE (t0)	DATA PRELIEVO A 6 SETTIMANE (t1)
1	TET 0001-001	07/11/2018	27/12/2018
2	TET 0003-001	16/11/2018	08/01/2019
3	TET 0001-004	16/11/2018	07/01/2019
4	TET 0001-006	20/12/2018	05/02/2019
5	TET 0003-003	16/01/2019	15/03/2019
6	TET 0004-001	28/02/2019	11/04/2019
7	TET 0001-010	05/03/2019	29/04/2019
8	TET 0006-001	30/10/2019	20/11/2019
9	TET 0006-002	21/11/2019	12/12/2019
10	TET 0006-003	02/01/2020	24/01/2020
11	TET 0003-013	28/01/2020	10/03/2020
12	TET 0006-004	03/02/2020	26/02/2020
13	TET 0003-016	18/02/2020	14/04/2020
14	TET 0004-004		18/05/2020
15	TET 0001-024	16/04/2020	
16	TET 0007-001	24/01/2020	10/03/2020
17	TET 0007-002	08/09/2020	20/10/2020
18	TET 0007-004	31/08/2021	02/11/2021
19	TET 0007-005	14/02/2022	

Tabella 7: campioni di plasma storati presso il nostro centro e raccolti ai diversi timepoints.

Su tali campioni partiranno le analisi, in particolare la valutazione dei miRNA circolanti, al fine di individuare potenziali biomarcatori dal ruolo prognostico e di valutare eventuali correlazioni con diversi *outcome* clinici.

Ad oggi, i vari centri partecipanti allo studio hanno arruolato 26 pazienti. Al raggiungimento dei primi 30 pazienti arruolati (lo studio ne prevede 60) sarà possibile dare avvio ad una prima analisi statistica ad-interim, che porterà alla pubblicazione del primo dei lavori scientifici programmati.

La figura 9 illustra lo stato di arruolamento dello studio, al 10 dicembre 2021, tra i vari centri coinvolti.

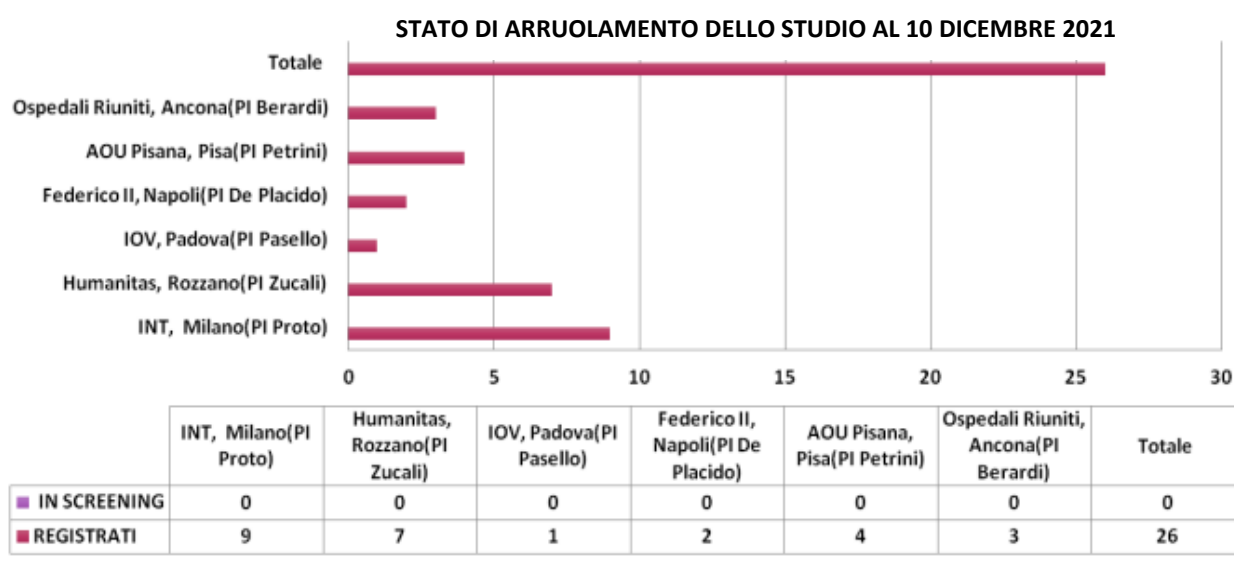


Figura 9: centri coinvolti e status dell'arruolamento nello studio al 10 dicembre 2021.

5. *Discussione*

I TETs sono malattie rare ed estremamente eterogenee da un punto di vista biologico. La diversa risposta ai trattamenti è strettamente connessa alla differente biologia riscontrata all'interno dei vari sottotipi e, nonostante gli avanzamenti nella caratterizzazione biomolecolare, questo rappresenta un aspetto ancora ad oggi ampiamente sconosciuto. La complessità di queste malattie necessita di una gestione multidisciplinare per l'individuazione di un adeguato percorso di terapie.

La ricerca di mutazioni geniche e un estensivo sequenziamento del genoma sono stati condotti nell'intento di interferire con le principali vie di segnalazione alla base della crescita di questi tumori. Alcune evidenze scientifiche ci spingono a sperimentare nuove terapie basate su approcci anti-angiogenici. In effetti, le stesse suggeriscono come l'angiogenesi giochi un ruolo importante nei TETs.

Il progetto esame ha previsto una prima fase di analisi retrospettive su casistica di pazienti con neoplasie timiche (timoma o carcinoma timico) che ha trovato seguito, nella seconda fase, con la conduzione di attività prospettiche, con l'obiettivo di definire il ruolo di nuovi potenziali biomarcatori come miRNA e Polimorfismi a Singolo Nucleotide (SNPs) a carico di geni che regolano l'angiogenesi e di approfondirne il significato prognostico e predittivo di risposta a trattamenti, effettuando una distinzione tra i vari outcome clinici.

In quest'ottica, nella fase retrospettiva sono stati analizzati polimorfismi a singolo nucleotide dei seguenti geni coinvolti nell'angiogenesi: VEGF-A, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- α e HIF1- α . Il primo risultato è stato l'evidenza di un'aumentata frequenza del polimorfismo rs35597368 T di PDGFR- α nelle neoplasie timiche rispetto alla popolazione generale. Questo dato sembrerebbe confermare che tale polimorfismo rappresenti un fattore di rischio per l'insorgenza di neoplasie epiteliali timiche. Tuttavia, ulteriori studi che valutino la suscettibilità di individui portatori di tale SNP, anche ad altre neoplasie, renderebbero più robusta questa ipotesi. Prima di questo studio, erano esigui i lavori in letteratura relativi a SNPs di PDGFR- α , ampiamente noto per l'alto tasso mutazionale del gene nell'ambito dei TETs [88]. Buona parte di quelli esistenti fa riferimento all'isoforma β e ad altra patologia tumorale, dimostrando un'associazione significativa di alcuni SNPs con il rischio di insorgenza tumorale e un impatto negativo sulla prognosi [89].

Altri polimorfismi analizzati nel presente studio compaiono con frequenza più bassa rispetto alla popolazione generale e sono pertanto informativi di un possibile ruolo "protettivo".

Per quanto riguarda HIF-1 α , il polimorfismo rs11549465 C è più frequente nella popolazione generale. Lo studio in questione non sembra presentare un risultato discordante con quanto

riportato in letteratura in cui spesso è stata valutata la possibile associazione tra polimorfismi a carico del gene HIF-1 e cancro, anche se questa rappresenta ancora un'area di ricerca che richiede ampia esplorazione e per la quale emergono informazioni spesso contrastanti [90] [91] [92]. Recentemente, sono pervenute acquisizioni in merito al contributo di un discreto spettro di polimorfismi a carico del gene HIF-1 α nello sviluppo di tumori al polmone, a conferma di quanto già dimostrato in precedenti lavori [93] [94]. Alcune evidenze in particolare sottolineano l'importanza dei polimorfismi rs11549465, rs11549467, rs2057482, rs10873142, e rs41508050 [95]. Una metanalisi effettuata nel 2015 attesta la presenza di un legame tra l'allele T del polimorfismo rs11549465 e l'insorgenza di alcuni tumori, specie nella popolazione asiatica ove viene dimostrata un'associazione significativa tra lo stesso e un maggior rischio di sviluppo di tumore mammario e polmonare. Sebbene il polimorfismo sembri essere relato invece ad minore probabilità di comparsa di malattia nella popolazione caucasica, nella stessa determina un maggior rischio di insorgenza del tumore ginecologico [96]. Nello studio in esame, il mancato incremento della frequenza dell'allele T è probabilmente imputabile alla prevalenza di etnia caucasica, rispetto a quella asiatica, all'interno della casistica selezionata, e dell'ampiezza del campione analizzato che è discretamente contenuto, vista anche la rarità della patologia: infatti l'analisi in oggetto indicava una frequenza dell'allele T pari al 1,75%.

Anche il polimorfismo di HIF1- α rs2057482 C è più frequente nella popolazione generale rispetto ai pazienti affetti da neoplasie timiche e sembra svolgere un ruolo protettivo. Fu e collaboratori hanno rivelato, in uno studio del 2013, un'associazione tra elevate frequenze dell'allele C e elevato rischio di sviluppo di cancro alla cervice nelle donne cinesi, dato che tuttavia non ha trovato conferma in indagini successive [97]. L'indagine sul polimorfismo è stata effettuata nell'ambito della patologia polmonare ove ha confermato un possibile ruolo protettivo, non essendo stata fornita alcuna evidenza circa una possibile associazione tra il polimorfismo e rischio di insorgenza del tumore [95].

Altri polimorfismi di HIF-1 α si sono rivelati significativamente più frequenti nella popolazione generale: rs1951795 C, rs2301113 A, rs10873142 T, rs11158358 C e rs12434438 A. Non vi sono stati, prima di questo lavoro, molti studi che hanno investigato tali polimorfismi. La presente analisi ha prodotto risultati che sono stati confermati con il prosieguo delle attività condotte dal gruppo di ricerca del centro, a cui ho attivamente collaborato, in un setting di pazienti con neoplasie maligne o benigne del timo (includendo iperplasia, cisti timiche, timolipoma e residuo timico) sottoposti a timectomia, e sono stati oggetto di pubblicazione su rivista indexata, apportando un contributo importante nell'identificazione di possibili biomarcatori con un ruolo nello sviluppo di lesioni timiche e nell'outcome clinico [32].

Nello studio, un rilievo particolare viene acquisito dal significativo aumento della frequenza del polimorfismo rs307821 C di VEGFR-3 nei pazienti affetti da timoma rispetto a quelli con carcinoma timico, dato che lascia supporre l'esistenza di una possibile associazione del polimorfismo con un minor grado di malignità e, verosimilmente, un outcome clinico migliore nei pazienti portatori. La letteratura fornisce evidenze relative a polimorfismi del gene con implicazioni in tutt'altro ambito oncologico ed in particolare associati al rischio di sviluppare tumore in neoplasie come carcinoma epatocellulare, carcinoma del cavo orale, carcinoma gastrico e della cervice uterina [98]. Al momento, il polimorfismo in questione è stato indagato dal gruppo di ricerca del nostro centro nell'ambito neoplasie neuroendocrine gastro-entero-pancreatiche in cui, contrariamente a quanto emerge dallo studio, sembra invece essere associato a peggiori prognosi e outcome clinico [99].

La presente tesi ha inoltre documentato risultati interessanti per quanto riguarda l'aumento della sopravvivenza globale nei pazienti che presentavano alcuni polimorfismi.

Per quanto riguarda il gene di VEGFR-2, il polimorfismo rs1870377 A risulta essere significativamente correlato ad un tempo di sopravvivenza più lungo. In merito a questo, sono emersi però dati contrastanti. In uno studio di Kim e colleghi del 2012 viene dimostrato che i polimorfismi A e A/T nei pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule avevano una prognosi migliore rispetto al polimorfismo T, in termini di sopravvivenza libera da malattia e sopravvivenza globale [100]. Tuttavia, nel medesimo ambito ematologico un'analisi condotta più recentemente su popolazione caucasica non attesterebbe alcun impatto del polimorfismo in termini prognostici, diversamente invece da quanto noto per altri tumori solidi come carcinoma ovarico e tumori del tratto testa collo [101].

Il polimorfismo rs307826 C di VEGFR-3 è anch'esso associato ad un aumento della sopravvivenza globale, in contrasto con quanto riportato invece da altri studi su pazienti affetti da carcinoma renale trattati con sunitinib, ove l'allele variante sembra correlare con un outcome peggiore [102] [103]. Anche questo risultato è stato oggetto di successive indagini dal parte del nostro gruppo di lavoro, che ha trovato conferma nei dati raccolti durante il triennio di dottorato contribuendo ad arricchire le conoscenze in merito all'impatto dei polimorfismi del gene del recettore sulla prognosi dei TETs.

Cinque polimorfismi di HIF-1 α sono stati associati ad un aumento della sopravvivenza globale: rs1951795 C, rs2301113 C, rs10873142 T/C, rs11158358G/ C e rs2057482 C/T. È interessante notare come, in uno studio che ricercava possibili fattori prognostici nell'ambito dell'infarto del miocardio, è stata dimostrata l'associazione significativa tra il polimorfismo rs10873142 T/C e un incrementato rischio di comparsa di episodi di malattia arteriosa coronarica (CAD) [104]. In

campo oncologico, uno scarso numero di pubblicazioni esplora la variante allelica in questione. Quin e collaboratori, in un lavoro del 2013 dimostravano la correlazione significativa tra la stessa e una minor frequenza di metastatizzazione linfonodale in 620 pazienti con carcinoma renale [105].

Dall'analisi delle caratteristiche cliniche-patologiche, è emerso che pazienti con tumore primitivo con diametro inferiore a 5 cm hanno un vantaggio statisticamente significativo in termini di sopravvivenza rispetto a quelli con diametro tumorale maggiore di 5 cm. In accordo con tale risultato, in un recente studio viene dimostrato che le dimensioni della lesione rappresentano un fattore che non impatta sulla prognosi oltre il cut-off di 5,5 cm [106]. La dimensione del tumore può rivelarsi pertanto un fattore prognostico da tenere in considerazione in caso di malattia di estensione ridotta.

In relazione alle attività prospettiche, considerate le difficoltà connesse all'evoluitività della pandemia da COVID19 che ha inevitabilmente rallentato le attività relative allo studio e all'arruolamento, determinando di conseguenza una scarsa disponibilità di dati clinici dei pazienti da selezionare in base alla risposta alla terapia, l'avvio delle analisi traslazionali previste dal progetto ha subito un ritardo tale da non consentire l'operatività e pertanto determinando la produzione di dati prospettici che necessitano ulteriori approfondimenti.

L'analisi di validazione dei miRNA circolanti, che rappresenterà un tassello fondamentale per la valutazione di nuovi possibili biomarcatori dal ruolo prognostico e predittivo di risposta al trattamento antiangiogenico nei tumori epiteliali del timo, non è stata ancora effettuata, ma partirà nel breve periodo compatibilmente con l'autorizzazione da parte del centro coordinatore dello studio, anche e soprattutto in considerazione del notevole interesse nell'ambito patologico in questione e il bisogno di identificare strategie terapeutiche efficaci sulla base di una più solida conoscenza dei setting di pazienti responsivi al trattamento.

Partendo da una più critica e dettagliata analisi delle caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati nel protocollo, potranno essere in futuro forniti elementi validi per poter valutare anche una possibile correlazione tra determinati quadri clinici riscontrati in fase di esordio di malattia e migliori profili di risposta ai trattamenti anti-angiogenici nei TETs, consentendo di selezionare a priori pazienti che potrebbero beneficiare di tali approcci di cura.

Su queste basi, verranno incentivate numerose attività di ricerca clinica e traslazionale.

A testimonianza di ciò, si inserisce il network TYME, promotore del protocollo, e l'egregio e costante lavoro svolto in questi anni da strutture d'eccellenza italiane per il management delle neoplasie timiche.

Dal 2017, in effetti, la rete TYME ha sostenuto fortemente l'importanza di una gestione multidisciplinare dei TETs, riunendo per la prima volta nel 2018 specialisti ed associazioni di pazienti (*Tu.To.R - Tumori Toracici Rari*) provenienti dall'intero territorio italiano fino ad arrivare oggi a coordinare realtà italiane coinvolte nel trattamento di questa malattia con l'obiettivo di offrire i migliori strumenti per la diagnosi e terapie. I temi affrontati nel corso di questo primo importantissimo incontro sono stati oggetto di pubblicazioni su riviste indexate in ambito oncologico.

Sono proseguiti i periodici incontri telematici e teleconferenze del network, promotore dello studio in esame, per dare altresì continuità ai rapporti di collaborazione tra i vari centri esperti nella diagnosi e cura delle neoplasie timiche, di cui fa parte la Clinica Oncologica del Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari, Università Politecnica delle Marche - Ospedali Riuniti di Ancona. L'impegno della rete si è manifestato attraverso un importante contributo nell'istituzione di un nuovo registro italiano di tumori epiteliali timici, partendo da una sistematica raccolta retrospettiva dei dati tra i vari centri coinvolti con lo sviluppo di un'apposita *electronic Case Report Form* (e-CRF) per l'archiviazione informatizzata degli stessi e l'individuazione di figure dedicate ad attività di data management.

Tra i principali obiettivi del network sono state attivate inoltre progettualità annesse allo studio, tra le quali la promozione di nuovi trial clinici, ove rientra lo studio RELEVENT (Studio di fase 2 con Ramucirumab, Carboplatino e Paclitaxel in pazienti non precedentemente trattati con carcinoma Timico e/o Timoma B3 con area di carcinoma) ed ha fornito il proprio apporto alla redazione nel 2020 delle prime raccomandazioni in Italia (in linea con le linee guida definite dall'European Society of Medical Oncology) per la migliore presa in carico dei pazienti affetti da queste patologie rare per le quali esistevano indicazioni fino a quel momento basate soltanto su studi non randomizzati e dati retrospettivi in serie limitata.

Infine, il gruppo ha svolto un'intensa attività di pubblicazione scientifica che ha portato alla stesura di un lavoro (attualmente in fase di sottomissione) inerente uno studio clinico osservazionale promosso dal network nel contesto dell'epoca pandemica.

È stato dato seguito alle attività di implementazione e gestione del sito web dedicato, di libera consultazione, tramite cui vengono costantemente dispensate informazioni utili a professionisti ed a pazienti in merito alla diagnosi della malattia, ai centri di cura e di trattamento con trial clinici cui potersi rivolgere. Nel contesto di Ancona, è stato fornito un contributo alla creazione del sito web www.corm-marche.it del Centro Oncologico e di Ricerca delle Marche (C.O.R.M.) dell'Università Politecnica delle Marche - Ospedali Riuniti di Ancona, un struttura dotata di uno spazio multimediale con strumentazione informatica all'avanguardia in grado di garantire una

stretta connessione con il territorio e presso cui si concentrano competenze multidisciplinari che mettono a disposizione, durante i periodici incontri telematici, il proprio *knowhow* per la definizione dei migliori percorsi di cura di pazienti affetti da tumori epiteliali del timo, in particolare all'interno del gruppo CANTO (Centro Accoglienza Neoplasie TORaciche). Il centro si avvale di una piattaforma di telemedicina, della quale è stata definita la struttura ed i processi per l'upload di documentazione sanitaria, con cui medici dal territorio hanno la possibilità di trasmettere casi di TETs da discutere in sede multidisciplinare. È stato dato supporto per la realizzazione di un database informatizzato per la raccolta di contatti ed indirizzari di medici di medicina generale nell'ottica di avviare una campagna informativa in merito all'esistenza di questo servizio per la gestione da remoto di pazienti affetti dalla patologia.

Le innumerevoli progettualità fin qui descritte e le molteplici attività ad esse annesse, forti delle efficaci e costanti connessioni con le associazioni e gli stessi pazienti, gettano pertanto le basi per lo sviluppo di una visione innovativa e di presa in carico globale per il management di neoplasie rare, complesse ed estremamente eterogenee come quelle del timo.

6. Conclusioni

Il presente studio aveva l'obiettivo di implementare le conoscenze in merito alle strategie terapeutiche per il trattamento dei TETs, neoplasie rare ed estremamente eterogenee da un punto di vista biologico. In particolare, una più approfondita indagine rispetto alla caratterizzazione biologica delle stesse avrebbe agevolato l'identificazione di biomarcatori e vie di segnalazione implicate nel processo della carcinogenesi potenzialmente bersagliabili da farmaci e combinazioni di farmaci innovativi. La letteratura attesta il ruolo chiave dell'angiogenesi nell'insorgenza del tumore: il fattore VEGF è overespresso nei TETs e associato ad una maggiore invasività e stadio avanzato di malattia. Il lavoro si è focalizzato in particolare sulla valutazione di possibili biomarcatori in grado di predire la prognosi o la risposta a trattamenti, in particolare anti-angiogenici. L'analisi retrospettiva di polimorfismi a singolo nucleotide a carico di geni coinvolti nell'angiogenesi (VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- α , HIF1- α) ha dimostrato un'associazione significativa con la prognosi all'interno della casistica di TETs selezionata. Tali risultati, unitamente alla valutazione dell'espressione di miRNA, contribuiranno alla definizione di potenziali fattori dal ruolo prognostico o predittivo di risposta a trattamenti anti-angiogenici, rafforzando le basi scientifiche ad oggi disponibili per progettare strategie terapeutiche innovative di successo, e potranno rivelarsi in futuro importanti per la predizione dell'outcome clinico e il chiarimento di alcuni degli aspetti ancora irrisolti relativamente al trattamento di queste patologie.

Riconoscimento: per il progetto RELEVENT sono stati stanziati fondi AIFA per la ricerca indipendente sui farmaci, bando 2016.

7. Bibliografia

1. D. Serpico, A. Trama, E. R. Haspinger, F. Agustoni, L. Botta, R. Berardi, G. Palmieri, P. Zucali, R. Gallucci, M. Broggin, G. Gatta, U. Pastorino, G. Pelosi, F. de Braud & M. C. Garassino¹, on behalf of TYME (TYmic MalignanciEs) Collaborative Group. Available evidence and new biological perspectives on medical treatment of advanced thymic epithelial tumors. *Annals of Oncology* 26: 838–847, 2015 doi:10.1093/annonc/mdu527.
2. Martina Imbimbo, Margaret Ottaviano, Milena Vitali, Alessandra Fabbri, Giovanni Leuzi, Michele Fiore, Davide Franceschini, Giulia Pasello, Matteo Perrino, Marco Schiavon, Giancarlo Pruneri, Angelo Paolo Dei Tos, Claudia Sangalli, Marina Chiara Garassino, Rossana Berardi, Alessandra Alessi, Giuseppina Calareso, Iacopo Petrini, Marta Scorsetti, Vieri Scotti, Lorenzo Rosso, Federico Rea, Ugo Pastorino, Paolo Giovanni Casali, Sara Ramella, Umberto Ricardi, Laura Abate Daga, Valter Torri, Giovannella Palmieri, Mirella Marino, Paolo Andrea Zucali. Best practices for the management of thymic epithelial tumors: a position paper by the italian collaborative group for thymic malignancies (TYme). *Cancer Treatment Review*, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.10.001>.
3. Rossana Berardi, Mariagrazia De Lisa, Silvia Pagliaretta, Azzurra Onofri, Francesca Morgese, Agnese Savini, Zelmira Ballatore, Miriam Caramanti, Matteo Santoni, Paola Mazzanti, Stefano Cascinu. *Thymic Neoplasms; an update on the use of chemotherapy and new targeted therapies*. *Anti-tumor Treatment*, volume 40, issue 4, P495-506, May 2014, <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.11.003>
4. Napieralska, A.; Miszczyk, L. Thymic Tumours in Children. *Pediatr. Rep.* 2022, 14, 1–7. <https://doi.org/10.3390/pediatric14010001>.
5. Teresa Stachowicz-Stencel, Anna Synakiewicz, Marianna Cornet, Andrea Ferrari, Marina Garassino, Jordi Remon Masip, Rod Julien, Calogero Virgone, Dominik T Schneider, Ines B Brecht, Tal Ben-Ami, Ewa Bien, Yves Reguerre, Jan Godzinski, Gianni Bisogno, Daniel Orbach, Sabine Sarnacki. Thymoma and thymic carcinoma in children and adolescents: The EXPeRT/PARTNER diagnostic and therapeutic recommendations. *Pediatr Blood Cancer* 2021 Jun;68 Suppl 4:e29042. doi: 10.1002/pbc.29042. Epub 2021 Apr 21.
6. Eric A. Engels. Epidemiology of thymoma and associated malignancies Published in final edited form as: *J Thorac Oncol.* 2010 October; 5(10 Suppl 4): S260–S265. doi:10.1097/JTO.0b013e3181f1f62d
7. N. Teresa Bellissimo, Federica Ganci, Enzo Gallo, Andrea Sacconi, Claudia Tito, Luciana De Angelis, Claudio Pulito, Silvia Masciarelli, Daniele Diso, Marco Anile, Vincenzo Petrozza, Felice Giangaspero, Edoardo Pescarmona, Francesco Facciolo, Federico Venuta, Mirella Marino, Giovanni Blandino e Francesco Fazi. *Thymic Epithelial Tumors phenotype relies on miR-145-5p epigenetic regulation*. *Molecular Cancer* (2017) 16:88. DOI 10.1186/s12943-017-0655-2
8. Tateo, V., Manuzzi, L., Parisi, C., De Giglio A, Campana, D., Pantaleo, M.A.; Lamberti, G. An Overview on Molecular Characterization of Thymic Tumors: Old and New Targets for Clinical Advances. *Pharmaceuticals* 2021, 14, 316. <https://doi.org/10.3390/ph14040316>;
9. Clémence Basse and Nicolas Girard. Thymic tumours and their special features. *Eur Respir Rev* 2021; 30: 200394 [DOI: 10.1183/16000617.0394-2020].
10. Teresa Bellissimo, Emanuele Russo, Federica Ganci, Carmen Vico, Andrea Sacconi, Flavia Longo, Domenico Vitolo, Marco Anile, Daniele Disio, Mirella Marino, Giovanni Blandino, Federico Venuta e Francesco Fazi. Circulating miR-21-5p and miR-148a-3p as emerging non-invasive biomarkers in thymic epithelial tumors. *CANCER BIOLOGY & THERAPY*, 2016, VOL. 17, NO. 1, 79–82, <http://dx.doi.org/10.1080/15384047.2015.1108493>.
11. Standring S, *Anatomia del Grey*, Elsevier Masson 2009.

12. Mariuzzi G.M. *Anatomia Patologica e correlazioni anatomo-cliniche*. Piccin 2007.
13. Levine GD, Rosai J, Bearman RM, Polliack A. The fine structure of thymoma, with emphasis on its differential diagnosis. A study of ten cases. *Am J Pathol.* 1975 Oct; 81(1):49-86. PubMed PMID: 1080957; PubMed Central PMCID: PMC2032290.
14. Detterbeck FC, Parsons AM. Thymic tumors. *Ann Thorac Surg.* 2004 May; 77(5):1860-9. Review. PubMed PMID: 15111216.
15. William D. Travis, Elizabeth Brambilla, H. Konrad Müller-Hermelink and Curtis C. Harris. *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. IARC 2004.
16. Clémence Basse and Nicolas Girard. Thymic tumours and their special features. *Eur Respir Rev* 2021; 30: 200394. DOI: 10.1183/16000617.0394-2020;
17. Fabrizio Minervini, Laura Boschetti, Michael Gregor, Mariano Provencio, Virginia Calvo, Peter B. Kestenholz, Savvas Lampridis, Davide Patrini, Pietro Bertoglio, L. Filipe Azenha, Consolato M. Sergi, Gregor J. Kocher. Thymic tumours: a single center surgical experience and literature review on the current diagnosis and management of thymic malignancies. *Gland Surg* 2021;10(11):3128-3140 <https://dx.doi.org/10.21037/gS-21-517>;
18. William D Travis, Elisabeth Brambilla, Andrew G Nicholson, Yasushi Yatabe, John H M Austin, Mary Beth Beasley, Lucian R Chirieac, Sanja Dacic, Edwina Duhig, Douglas B Flieder, Kim Geisinger, Fred R Hirsch, Yuichi Ishikawa, Keith M Kerr, Masayuki Noguchi, Giuseppe Pelosi, Charles A Powell, Ming Sound Tsao, Ignacio Wistuba, WHO Panel. *World Health Organization classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Lyon, IARC Press, 2015;
19. Alexander Marx, John K. C. Chan, Lara Chalabreysse, Sanja Dacic, Frank Detterbeck, Christopher A. French, Jason L. Hornick, Hiroshi Inagaki, Deepali Jain, Alexander J. Lazar, Mirella Marino, Edith M. Marom, Andre L. Moreira, Andrew G. Nicholson, Masayuki Noguchi, Daisuke Nonaka, Mauro G. Papotti, Stefan Porubsky, Lynette M. Sholl, Hisashi Tateyama, Vincent Thomas de Montpréville, William D. Travis, Arun Rajan, Anja C. Roden, Philipp Ströbel. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Thymus and Mediastinum: What Is New in Thymic Epithelial, Germ Cell, and Mesenchymal Tumors? *Journal of Thoracic Oncology* Vol. 17 No. 2: 200–213. 4 <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.10.010>;
20. Radovich, M.; Pickering, C.R.; Felau, I.; Ha, G.; Zhang, H.; Jo, H.; Hoadley, K.A.; Anur, P.; Zhang, J.; McLellan, M.; et al. The Integrated Genomic Landscape of Thymic Epithelial Tumors. *Cancer Cell* 2018, 33, 244–258;
21. Petrini, I.; Meltzer, P.S.; Kim, I.-K.; Lucchi, M.; Park, K.-S.; Fontanini, G.; Gao, J.; A Zucali, P.; Calabrese, F.; Favaretto, A.; et al. A specific missense mutation in GTF2I occurs at high frequency in thymic epithelial tumors. *Nat. Genet.* 2014, 46, 844–849;
22. Shitara, M.; Okuda, K.; Suzuki, A.; Tatematsu, T.; Hikosaka, Y.; Moriyama, S.; Sasaki, H.; Fujii, Y.; Yano, M. Genetic profiling of thymic carcinoma using targeted next-generation sequencing. *Lung Cancer* 2014, 86, 174 -179;
23. Rajan, A.; Girard, N.; Marx, A. State of the Art of Genetic Alterations in Thymic Epithelial Tumors. *J. Thorac. Oncol.* 2014, 9, S131–S136;
24. Petrini, I.; Wang, Y.; Zucali, P.A.; Lee, H.S.; Pham, T.; Voeller, D.; Meltzer, P.S.; Giaccone, G. Copy Number Aberrations of Genes Regulating Normal Thymus Development in Thymic Epithelial Tumors. *Clin. Cancer Res.* 2013, 19, 1960–1971;
25. Federica Ganci Carmen Vico, Etleva Korita, Andrea Sacconi, Enzo Gallo, Federica Mori, Annamaria Cambria, Emanuele Russo, Marco Anile, Domenico Vitolo, Edoardo Pescarmona, Rosario Blandino, Francesco Facciolo, Federico Venuta, Giovanni Blandino, Mirella Marino, Francesco Fazi. MicroRNA expression profiling of thymic epithelial tumors. *Lung Cancer* 2014, 85, 197–204;

26. Teresa Bellissimo, Emanuele Russo, Federica Ganci, Carmen Vico, Andrea Sacconi, Flavia Longo, Domenico Vitolo, Marco Anile, Daniele Disio, Mirella Marino, Giovanni Blandino, Federico Venuta e Francesco Fazi. Circulating miR-21-5p and miR-148a-3p as emerging non-invasive biomarkers in thymic epithelial tumors. *Cancer Biology & Therapy*, 2016, VOL. 17, NO. 1, 79-82, <http://dx.doi.org/10.1080/15384047.2015.1108493>;
27. Marta Scorsetti, Francesco Leo, Annalisa Trama, Rolando D'Angelillo, Danila Serpico, Marianna Macerelli, Paolo Zucali, Gemma Gatta, Marina Chiara Garassino. Thymoma and thymic carcinomas. *Critical Reviews in Oncology/Hematology Volume 99*, March 2016, Pages 332-350;
28. Zucali, P.A.; De Pas, T.; Palmieri, G.; Favaretto, A.; Chella, A.; Tiseo, M.; Caruso, M.; Simonelli, M.; Perrino, M.; De Vincenzo, F.; et al. Phase II Study of Everolimus in Patients with Thymoma and Thymic Carcinoma Previously Treated with Cisplatin-Based Chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 2018, 36, 342-349;
29. Kirzinger, L.; Boy, S.; Marienhagen, J.; Schuierer, G.; Neu, R.; Ried, M.; Hofmann, H.-S.; Wiebe, K.; Ströbel, P.; May, C.; et al. Octreotide LAR and Prednisone as Neoadjuvant Treatment in Patients with Primary or Locally Recurrent Unresectable Thymic Tumors: A Phase II Study. *PLoS ONE* 2016, 11, e0168215;
30. Palmieri, G.; Montella, L.; M.D., A.M.; Muto, P.; Di Vizio, D.; M.D., A.D.C.; Lastoria, S. Somatostatin analogs and prednisone in advanced refractory thymic tumors. *Cancer* 2002, 94, 1414–1420;
31. Weilin Yang, Sai Chen, Xinxin Cheng, Bo Xu, Huilan Zeng, Jianyong Zou, Chunhua Su, Zhenguang Chen. Characteristics of genomic mutations and signaling pathway alterations in thymic epithelial tumors. *Ann Transl Med* 2021;9(22):1659 <https://dx.doi.org/10.21037/atm-21-5182>;
32. Rossana Berardi, Alessandro Brunelli, Silvia Pagliaretta, Vittorio Paolucci, Alessandro Conti, Gaia Goteri, Majed Refai, Cecilia Pompili, Giulia Marcantognini, Francesca Morgese, Zelmira Ballatore, Agnese Savini, Mariagrazia De Lisa, Miriam Caramanti, Matteo Santoni, Antonio Zizzi, Francesco Piva, Paola Mazzanti, Azzurra Onofri, Armando Sabbatini, Marina Scarpelli, Stefano Cascinu. Impact of VEGF, VEGFR, PDGFR, HIF and ERCC1 gene polymorphisms on thymic malignancies outcome after thymectomy. *Oncotarget*, 2015 Aug 7;6(22):19305-15; doi: 10.18632/oncotarget.4191;
33. Thomas, A.; Rajan, A.; Berman, A.; Tomita, Y.; Brzezniak, C.; Lee, M.-J.; Lee, S.; Ling, A.; Spittler, A.J.; A Carter, C.; et al. Sunitinib in patients with chemotherapy-refractory thymoma and thymic carcinoma: An open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015, 16, 177–186;
34. Rosato - de-Christanson ML, Galobrdes J, Moran CA. Thymomas: radiologi- pathologic correlation. *Radiographics.* 1992;12:151-168;
35. Edith M, Maron, MD: Imaging Thymoma. *J Thorac Onc* 2010;5 (10 suppl4);
36. Mather MM, Shepard JA. Imaging of thymoma. *Semin of thorac Cardiovasc Surg* 2005;17:12-19;
37. Shamij F, Pearson FG, Todd T Ginsberg RJ. Ives R, Cooper JD. Result of surgical treatment of thymoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1984;87: 43-47
38. Herman SJ, Holub RV. Weisbrod G et al: Thymoma: a multivariate analysis of factor predicting survival. *Ann Thorac Surg* 1995; 60; 908-914;
39. F. Conforti, M. Marino, V. Vitolo, L. Spaggiari, R. Mantegazza, P. Zucali, E. Ruffini, L. di Tommaso, G. Pelosi, M. Barberis, I. Petrini, G. Palmieri, G. Pasello, G. Galli, R. Berardi, M. Garassino, P. Filosso, M. Alloisio, M. Scorsetti, R. Orecchia, L. Pala, L. Abatedaga, S. Cinieri & T. De Pas. Clinical management of patients with thymic epithelial tumors: the recommendations endorsed by the Italian Association of Medical Oncology (AIOM). *Esmo Open*. Doi <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100188>;

40. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson A. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Fourth edition - WHO classification of tumours, vol. 7, IARC Lyon 2015, ISBN 978928322436;
41. Girum L Lemma I, Ju-Whei Lee, Seena C Aisner, Corey J Langer, William J Tester, David H Johnson, Patrick J Loehrer Sr. Phase II study of carboplatin and paclitaxel in advanced thymoma and thymic carcinoma. *J Clin Oncol.* 2011 May 20;29(15):2060-5. doi: 10.1200/JCO.2010.32.9607. Epub 2011 Apr 18;
42. F Hirai, T Yamanaka, K Taguchi, H Daga, A Ono, K Tanaka, Y Kogure, J Shimizu, T Kimura, J Fukuoka, Y Iwamoto, H Sasaki, K Takeda, T Seto, Y Ichinose, K Nakagawa, Y Nakanishi, West Japan Oncology Group. A multicenter phase II study of carboplatin and paclitaxel for advanced thymic carcinoma: WJOG4207L. *Ann Oncol.* 2015 Feb;26(2):363-8. doi: 10.1093/annonc/mdu541. Epub 2014 Nov 17;
43. Iacopo Petrini, Paolo A Zucali, Hye Seung Lee, Marbin A Pineda, Paul S Meltzer, Beatriz Walter-Rodriguez, Massimo Roncalli, Armando Santoro, Yisong Wang, Giuseppe Giaccone Petrini I, Zucali PA, Lee HS, et al. Expression and mutational status of c-kit in thymic epithelial tumors. *J Thorac Oncol.* 2010;5(9):1447-145;
44. Kiyotaka Yoh, Yutaka Nishiwaki, Genichiro Ishii, Koichi Goto, Kaoru Kubota, Hironobu Ohmatsu, Seiji Niho, Kanji Nagai, Nagahiro Saijo. Mutational status of EGFR and KIT in thymoma and thymic carcinoma. 2008 Dec;62(3):316-20. doi: 10.1016/j.lungcan.2008.03.013. Epub 2008 Apr 29;
45. Anca Maria Cimpean, Marius Raica, Svetlana Encica, Remus Cornea, Viorica Bocan. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor A (VEGF), and its receptors (VEGFR1, 2) in normal and pathologic conditions of the human thymus. *Ann Anat.* 2008;190:238-245;
46. Anna Teresa Alberobello, Yisong Wang, Frans Joseph Beerkens, Fabio Conforti, Justine N McCutcheon, Guanhua Rao, Mark Raffeld, Jing Liu, Raneen Rahhal, Yu-Wen Zhang, Giuseppe Giaccone. PI3K as a potential therapeutic target in thymic epithelial tumors. *J Thorac Oncol.* 2016;11: 1345-1356;
47. Iacopo Petrini, Yisong Wang, Paolo A Zucali, Hye Seung Lee, Trung Pham, Donna Voeller, Paul S Meltzer, Giuseppe Giaccone. Copy number aberrations of genes regulating normal thymus development in thymic epithelial tumors. *Clin Cancer Res.* 2013;19:1960-1971;
48. Wang Y, Thomas A, Lau C, et al. Mutations of epigenetic regulatory genes are common in thymic carcinomas. *Sci Rep.* 2014;4:7336;
49. Girard, N.; Shen, R.; Guo, T.; Zakowski, M.F.; Heguy, A.; Riely, G.J.; Huang, J.; Lau, C.; Lash, A.E.; Ladanyi, M.; et al. Comprehensive Genomic Analysis Reveals Clinically Relevant Molecular Distinctions between Thymic Carcinomas and Thymomas. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15, 6790–6799;
50. Kitadai, R.; Okuma, Y. Future Perspective of Chemotherapy and Pharmacotherapy in Thymic Carcinoma. *Cancers* 2021, 13, 5239. <https://doi.org/10.3390/cancers13205239>;
51. Kurup A, Burns M, Dropcho S. Phase II study of gefitinib treatment in advanced thymic malignancies. *J Clin Oncol* 2005; 23: abstr 7068;
52. Bedano PM, Perkins S, Burns M A Phase II trial of erlotinib plus bevacizumab in patients with recurrent thymoma or thymic carcinoma. *J Clin Oncol* 2008; 15 (suppl): abstr 19087;
53. Su Yudong, Meng Zhaoting, Wang Xinyue, Lin Li, Xu Xiaoyan, Zuo Ran, Chen Jinliang & Chen Peng. EGFR exon 20 insertion mutation in advanced thymic squamous cell carcinoma: Response to apatinib and clinical outcomes, *Thoracic Cancer* 9 (2018) 885–891 doi: 10.1111/1759-7714.12755;
54. Liang, J.; Wu, Y.-L.; Chen, B.-J.; Zhang, W.; Tanaka, Y.; Sugiyama, H. The C-Kit Receptor-Mediated Signal Transduction and Tumor-Related Diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 2013, 9, 435–443;

55. Catania, C.; Conforti, F.; Spitaleri, G.; Barberis, M.; Preda, L.; Noberasco, C.; Lazzari, C.; Toffalorio, F.; de Marinis, F.; Manzotti, M.; et al. Antitumor activity of sorafenib and imatinib in a patient with thymic carcinoma harboring c-KIT exon 13 missense mutation K642E. *Oncotargets Ther.* 2014, 7, 697–702;
56. Di,sel, U.; Öztuzcu, S.; Be,sen, A.A.; Karadeniz, C.; Köse, F.; Sümbül, A.T.; Sezer, A.; Nursal, G.N.; Abalı, H.; Özyılkan, Ö. Promising efficacy of sorafenib in a relapsed thymic carcinoma with C-KIT exon 11 deletion mutation. *Lung Cancer* 2011, 71, 109–112;
57. Lamberts, S.W.J.; Hofland, L.J. Anniversary Review: Octreotide, 40 years later. *Eur. J. Endocrinol.* 2019, 181, R173–R183;
58. Loehrer, P.J., Sr.; Wang, W.; Johnson, D.H.; Ettinger, D.S. Octreotide Alone or With Prednisone in Patients With Advanced Thymoma and Thymic Carcinoma: An Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial. *J. Clin. Oncol.* 2004, 22, 293–299;
59. Valentina Tateo, Lisa Manuzzi, Andrea De Giglio, Claudia Parisi, Giuseppe Lamberti, Davide Campana and Maria Abbondanza Pantaleo. Immunobiology of Thymic Epithelial Tumors: Implications for Immunotherapy with Immune Checkpoint Inhibitor. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 9056; doi:10.3390/ijms21239056;
60. Ettinger, D.S.; Wood, D.E.; Aggarwal, C.; Aisner, D.L.; Akerley, W.; Bauman, J.R.; Bharat, A.; Bruno, D.S.; Chang, J.Y.; Chirieac, L.R.; et al. Thymomas and Thymic Carcinomas, NCCN Guidelines, Version 1. 2020-27 November 2019;
61. Rajan, A.; Heery, C.R.; Thomas, A.; Mammen, A.L.; Perry, S.; O’Sullivan Coyne, G.; Guha, U.; Berman, A.; Szabo, E.; Madan, R.A.; et al. Efficacy and tolerability of anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) antibody (Avelumab) treatment in advanced thymoma. *J. Immunother. Cancer* 2019, 7, 269;
62. Giaccone, G.; Kim, C.; Thompson, J.; McGuire, C.; Kallakury, B.; Chahine, J.J.; Manning, M.; Mogg, R.; Blumenschein, W.M.; Tan, M.T.; et al. Pembrolizumab in patients with thymic carcinoma: A single-arm, single-centre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2018, 19, 347–355;
63. Kim, I.-K.; Rao, G.; Zhao, X.; Fan, R.; Avantiaggiati, M.L.; Wang, Y.; Zhang, Y.-W.; Giaccone, G. Mutant GTF2I induces cell transformation and metabolic alterations in thymic epithelial cells. *Cell Death Differ.* 2020, 27, 2263–2279;
64. Valentina Tateo, Lisa Manuzzi, Andrea De Giglio, Claudia Parisi, Giuseppe Lamberti, Davide Campana and Maria Abbondanza Pantaleo. Immunobiology of Thymic Epithelial Tumors: Implications for Immunotherapy with Immune Checkpoint Inhibitor. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 9056; doi:10.3390/ijms21239056;
65. Ferrara N: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* (2004) 25: 581-611;
66. Viallard, C.; Larrivé, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: Alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* 2017, 20, 409–426,
67. Schito, L. Hypoxia-Dependent Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Cancer. *Single Mol. Single Cell Seq.* 2019, 1136, 71–85;
68. Rossana Berardi, Gaia Goteri, Silvia Pagliaretta, Vittorio Paolucci, Francesca Morgese, Alessandro Conti, Majed Refai, Cecilia Pompili, Claudia Duranti, Giulia Marcantognini, Agnese Savini, Miriam Caramanti, Silvia Rinaldi, Mariangela Torniai, Matteo Santoni, Antonio Zizzi, Paola Mazzanti, Azzurra Onofri, Giulia Ricci, Marina Scarpelli. The role of angiogenetic single-nucleotide polymorphisms in thymic malignancies and thymic benign lesions. *J Thorac Dis* 2020;12(12):7245-7256 | <http://dx.doi.org/10.21037/jtd-19-3720>;
69. Martina Imbimbo, Milena Vitali, Alessandra Fabbri, Margaret Ottaviano, Giulia Pasello, Iacopo Petrini, Giovannella Palmieri, Rossana Berardi, Paolo Zucali, Monica Ganzinelli, Mirko Marabese, Massimo Broggin, Mirella Marino, Annalisa Trama, Eliana Rulli, Lital Hollander, Giancarlo Pruneri, Valter Torri, Marina Chiara Garassino. RELEVENT Trial: Phase II Trial of Ramucirumab, Carboplatin, and Paclitaxel in Previously Untreated

- Thymic Carcinoma/B3 Thymoma With Area of Carcinoma. *Clinical Lung Cancer*, Vol. 19, No. 5, e811-4^a 2018. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.06.005>;
70. Jordi Remon 1, Nicolas Girard 2, Julien Mazieres 3, Eric Dansin 4, Eric Pichon 5, Laurent Greillier 6, Catherine Dubos 7, Colin R Lindsay 1, Benjamin Besse 8. Sunitinib in patients with advanced thymic malignancies: Cohort from the French RYTHMIC network. *Lung Cancer*, 2016 Jul;97:99-104. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.04.024. Epub 2016 May 3;
 71. Maria Pagano, Nuria Maria Asensio Sierra, Michele Panebianco, Giulio Rossi, Roberta Gnoni, Giancarlo Bisagni, Corrado Boni. Sorafenib efficacy in thymic carcinomas seems not to require c-KIT or PDGFR-alpha mutations. *Anticancer Res*. 2014 Sep;34(9):5105-10;
 72. Iacopo Petrini, Arun Rajan, Trung Pham, Donna Voeller, Sean Davis, James Gao, Yisong Wang, Giuseppe Giaccone. Whole genome and transcriptome sequencing of a B3 thymoma. *PLoS One*. 2013;8(4):e60572. doi: 10.1371/journal.pone.0060572. Epub 2013 Apr 5.
 73. Vaziri SA, Kim J, Ganapathi MK, Ganapathi R. Vascular endothelial growth factor polymorphisms: role in response and toxicity of tyrosine kinase inhibitors. *Curr Oncol Rep*. 2010; 12:102–8;
 74. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Smith JD, Kruglyak L, Nickerson DA 2003. Additional SNP and Linkage disequilibrium analyses are necessary for whole genome association studies humans- *Nat Genet* 33: 518-521;
 75. HC Erichsen and SJ Chanock: SNP in cancer research and treatment. *BJC* 2004 90, 747-751;
 76. Liz J, Esteller M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development. *Biochim Biophys Acta*. 1859;2016:169–76. 27;
 77. Chen T, Dent SY. Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nat Rev Genet*. 2014;15:93–106. 28. You JS, Jones PA;
 78. Jueng Soo You, Peter A Jones. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell*. 2012;22:9–20;
 79. Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res* 2016;76:3666-70;
 80. Alberto Murrone, Luca Cantini, Federica Pecci, Valeria Cognigni, Cecilia Copparoni, Silvia Rinaldi, Ilaria Fiordoliva, Federica Monaco, Corrado Rubini, Francesca Barbisan, Alessia Cimadamore, Riccardo Giampieri, Francesca Bianchi, Marco Tomasetti, Monica Amati, Lory Santarelli, Rossana Berardi. BRCA-associated protein 1 (BAP1) and miR-31 combination predicts outcomes in epithelioid malignant pleural mesothelioma. *Journal of Thoracic Disease*, 2021;
 81. Malumbres M. miRNAs and cancer: an epigenetics view. *Mol Aspects Med*. 2013;34:863–74;
 82. Kim DH, Villeneuve LM, Morris KV, Rossi JJ. Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13:793–7;
 83. Chen C, Yin N, Yin B, Lu Q. DNA methylation in thoracic neoplasms. *Cancer Lett*. 2011;301:7–16. 32;
 84. Mokhtar M, Kondo K, Namura T, Ali AH, Fujita Y, Takai C, Takizawa H, Nakagawa Y, Toba H, Kajiura K, et al. Methylation and expression profiles of MGMT gene in thymic epithelial tumors. *Lung Cancer*. 2014;83:279–87;
 85. Lee GY, Yang WI, Jeung HC, Kim SC, Seo MY, Park CH, Chung HC, Rha SY. Genome-wide genetic aberrations of thymoma using cDNA microarray based comparative genomic hybridization. *BMC Genomics*. 2007;8:305;
 86. Badve S, Goswami C, Gokmen-Polar Y, Nelson Jr RP, Henley J, Miller N, Zaheer NA, Sledge Jr GW, Li L, Kesler KA, Loehrer Sr PJ. Molecular analysis of thymoma. *PLoS One*. 2012;7:e42669;

87. Petrini I, Rajan A, Pham T, Voeller D, Davis S, Gao J, Wang Y, Giaccone G. Whole genome and transcriptome sequencing of a b3 thymoma. *PLoS One*. 2013;8:e60572;
88. Tadashi Sakane, Yuma Sakamoto, Ayako Masaki, Takayuki Murase, Katsuhiko Okuda, Ryoichi Nakanishi, Hiroshi Inagaki. Mutation Profile of Thymic Carcinoma and Thymic Neuroendocrine Tumor by Targeted Next-generation Sequencing. *Clinical Lung Cancer*, 2021, DOI:<https://doi.org/10.1016/j.clcc.2020.11.010>;
89. Martha L. Slattery, Esther M. John, Mariana C. Stern, Jennifer Herrick, Abbie Lundgreen, Anna R. Giuliano, Lisa Hines, Kathy B. Baumgartner, Gabriela TorresMejia, and Roger K. Wolff. Associations with growth factor genes (FGF1, FGF2, PDGFB, FGFR2, NRG2, EGF, ERBB2) with breast cancer risk and survival: The Breast Cancer Health Disparities Study. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;
90. Li P, Cao Q, Shao PF, Cai HZ, Zhou H, Chen JW, Qin C, Zhang ZD, Ju XB, Yin CJ. Genetic polymorphisms in HIF1A are associated with prostate cancer risk in a Chinese population. *Asian J Androl* 2012; 14: 864-9;
91. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-32;
92. Clifford SC, Astuti D, Hooper L, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Maher ER. The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1alpha in renal cell carcinoma. *Oncogene* 2001; 20: 5067-74;
93. Yamamoto Y, Kiyohara C, Ogata-Suetsugu S, et al. Association between genetic polymorphisms involved in the hypoxia-inducible factor pathway and lung cancer risk: a case-control study in Japan. *Asia Pac J Clin Oncol* 2017;13:234–42;
94. He F, Qi Q, Li X, et al. Association of indoor air pollution, single nucleotide polymorphism of HIF-1alpha gene with susceptibility to lung cancer in Han population in Fujian Province. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2017;20:149–56;
95. Shuguang Xu, Kejing Ying. Association between HIF-1a gene polymorphisms and lung cancer. A meta-analysis. *Medicine*, 2020 <http://dx.doi.org/10.1097>;
96. Yujie Li, Chunyan Li, Hui Shi, Lieming Lou, Pengcheng Liu. The association between the rs11549465 polymorphism in the hif-1 α gene and cancer risk: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(2):1561-1574 www.ijcem.com /ISSN:1940-5901/IJCEM0004104;
97. Fu SL, Miao J, Ding B, Wang XL, Cheng WJ, Dai HH, Han SP: A polymorphism in the 3'untraslate region of hipoyxya –inducible factor-1 alpha confers an increased risk of cervical cancer in a Chinese population. *Neoplasm* 2013;
98. Lili Han, Sulaiya Husaiyin, Chunhua Ma, Mayinuer Niyazi. Association study between the polymorphisms of angiogenesis-related genes and cervical cancer susceptibility in Chinese Uygur population. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 2019 DOI: 10.1002/mgg3.899;
99. Rossana Berardi, Mariangela Torniai, Stefano Partelli, Corrado Rubini, Silvia Pagliaretta, Agnese Savini, Vanessa Polenta, Matteo Santoni, Riccardo Giampieri, Sofia Onorati, Federica Barucca, Alberto Murrone, Francesca Bianchi, Massimo Falconi. Impact of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) single nucleotide polymorphisms on outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *PLoS ONE* 2018, 13(5): e0197035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197035>;
100. MK. Kim, C. Suh, HS. Chi, HS. Cho et al: VEGFA and VEGFR2 genetic polymorphism and survival in patients with diffuse large B cell Lymphoma. *Cancer Sci* 2012;103(3):497-503. PubMed;
101. Dominic Kaddu-Mulindwa, Maciej Rosolowski, Marita Ziepert, Evi Regitz, Gunter Assmann, Moritz Bewarder, Gerhard Held, Michael Pfreundschuh, Jörg Thomas Bittenbring. VEGFR2 and VEGFA polymorphisms are not associated with an inferior prognosis in Caucasian patients with aggressive B-cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2021;106:100–104;

102. Garcia-Donas J, Leandro Garcia LJ, Gonzales Del Alba, et al: Prospective study assessing hypoxia related proteins as markers for the outcome of treatment with sunitinib in advanced clear cell renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2013;29(9):2409-14. PubMed;
103. J. Garcia-Donas, E. Esteban, LJ Leandro Garcia et al: Single nucleotide polymorphism association with response and toxic effect in patient with advanced renal-cell Carcinoma treated with first line sunitinib: a multicentre, observational prospective study. *Lancet Oncol* 2011; 12:1143-50. PubMed;
104. Yilan Li1, Shipeng Wang, Dandan Zhang, Xueming Xu, Bo Yu and Yao Zhang. The association of functional polymorphisms in genes expressed in endothelial cells and smooth muscle cells with the myocardial infarction. *Human Genomics* (2019) <https://doi.org/10.1186/s40246-018-0189-8>;
105. C. Quin, Q. Cao, X. Ju et al: the polymorphism in the VHL and HIF1A genes are associated with the prognosis but not the development of renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2012;23:981-989. PubMed;
106. Tumor size as a prognostic factor in limited-stage thymic epithelial tumors: A multicenter analysis. Jae Kwang Yun 1, Hyeong Ryul Kim 2, Dong Kwan Kim 1, Young Mog Shim 3, Young Tae Kim 4, Kyung Young Chung 5, Korean Association for Research on the Thymus (KART). *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2021 Jul;162(1):309-317.e9. doi: 10.1016/j.jtcvs.2020.05.048. Epub 2020 May 27.
107. Melis E, Gallo E, di Martino S, Gallina FT, Laquintana V, Casini B, Visca P, Ganci F, Alessandrini G, Caterino M, Cecere FL, Mandoj C, Papadantonakis A, De Bello N, Lattanzio R, Palmieri G, Garassino MC, Girard N, Conti L, Blandino G, Fazi F, Facciolo F, Pescarmona E, Ciliberto G e Marino M. Thymic Epithelial Tumors as a Model of Networking: Development of a Synergistic Strategy for Clinical and Translational Research Purposes. *Front. Oncol.* 10:922. doi: 10.3389/fonc.2020.00922