

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Linea di ricerca n. 1 : Integrazione di Approcci Terapeutici Innovativi e Nuove Tecnologie Strumentali e Biomolecolari

1 : Approcci clinico-terapeutici risk- oriented e patient-oriented e nuovi marcatori biologici per la diagnosi, il monitoraggio e la stratificazione prognostica delle emopatie neoplastiche

Responsabile: Musto Pellegrino

Programma:

Parole chiave: Mieloma, Linfomi, Sindromi Mielodisplastiche, Leucemie acute, Sindromi mieloproliferative, Biologia Molecolare, Citogenetica, Protocolli Clinici, PET, Targeted-Therapy

Altri enti coinvolti: Ematologia e Centro Emostasi e Trombosi, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, S. Giovanni Rotondo Citogenetica Dipartimento di Ematologia Università di Perugia Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Bari, GISL (Gruppo Italiano Studio Linfomi) IIL (Intergruppo Italiano Linfomi) GITMO (Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo, Commissione Trapianto Autologo) GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche) Myeloma Working Party U.O.Ematologia, Aziende Ospedaliere Cardarelli, Napoli Ematologia e Laboratorio di Biologia Molecolare Policlinico, Università di Milano Cattedre di Ematologia, Università Tor Vergata e Cattolica, Roma e Firenze Società Italiana di Ematologia Ematologia Policlinico S. Matteo Pavia EBMT (European Blood and Marrow Transplantation Registry)

Anno inizio: 2007

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Altro

Descrizione: La sopravvivenza globale dei pazienti affetti da patologie neoplastiche del sangue è notevolmente migliorata nel corso dell'ultimo decennio in relazione ai notevoli sviluppi delle attuali strumentazioni di indagine diagnostica, delle terapie di supporto disponibili, nonché alla disponibilità di farmaci di nuova generazione, con bersaglio molecolare, e di una migliore conoscenza dei criteri di selezione dei pazienti trattati con approcci trapiantologici intensivi. Una serie di evidenze di tipo sperimentale ha individuato, all'origine dei tumori ematologici umani, varie alterazioni di tipo genetico acquisite dalle cellule del midollo osseo. Questi studi hanno avuto un notevole impatto nella pratica clinica, non solo sul versante diagnostico, ma anche su quello terapeutico. È stata così aperta la strada che porta ad una razionale stratificazione prognostica delle neoplasie ematologiche basata sulla presenza di lesioni di specifici geni che determinano la alterazione di ben precisi pathways biochimici intracellulari con la conseguente alterazione delle caratteristiche di differenziazione, crescita ed apoptosi cellulare. Evidenze di natura epidemiologica prima e sperimentale poi, hanno altresì mostrato il ruolo patogenetico nella comparsa di patologie emolinfoproliferative di alcune infezioni di tipo virale o batterico, come quelle da HCV o da Helicobacter Pylori. Sono stati inoltre compiuti studi sulle caratteristiche metaboliche delle cellule neoplastiche che hanno portato allo sviluppo di tecnologie di diagnostica per immagini di tipo funzionale e molecolare con la introduzione nella pratica clinica della Tomografia ad Emissione di Positroni (PET-Scan), che ha notevolmente migliorato le possibilità di stadiazione post(chemio)terapica dei pazienti affetti da linfomi di Hodgkin e non-Hodgkin, consentendo in modo non invasivo la accurata discriminazione tra le masse fibro-necrotiche ed il residuo di malattia attiva, nonché la possibilità di verificare precocemente la risposta ai trattamenti chemioterapici, indirizzando verso strategie terapeutiche alternative i pazienti con risultati non ottimali. Del tutto recentemente, poi, è stata dimostrata la possibilità di controllare la crescita di alcuni tipi di neoplasie ematologiche utilizzando una nuova generazione di farmaci in grado di agire sulle modificazioni genetico-molecolari specifiche di quelle cellule neoplastiche e/o su recettori o molecole di membrana. In tal senso, sono in sperimentazione clinica o già commercializzati numerose molecole che derivano dagli studi sulla patogenesi molecolare dei tumori umani, come ad esempio quelle in grado di inibire specifiche classi di tirosino-chinasi, che sono state impiegate con gran successo nella terapia della leucemia mieloide cronica, della leucemia acuta linfoblastica Philadelphia positiva e delle leucemie eosinofile (imatinib, dasatinib, nilotinib). Vanno, in questo contesto, ricordati anche gli inibitori del proteosoma di vecchia e nuova generazione (bortezomib e carfilzomib), o i farmaci che agiscono con attività anti-angiogenetica ed immunomodulante (talidomide, lenalidomide e pomalidomide), attualmente ampiamente utilizzati nella terapia delle sindromi mielodisplastiche e del mieloma multiplo e che si avviano ad una più ampia verifica clinica in altre emopatie. Da ricordare anche i nuovi citostatici (clofarabina, antracicline liposomiali), caratterizzati da profili di efficacia/tossicità verosimilmente più favorevoli, e gli agenti ipometilanti (azacitidina, decitabina, inibitori delle istone-deacetilasi), che sono usati attualmente nella terapia cosiddetta epigenetica delle sindromi mielodisplastiche e delle leucemie acute. Un'altra categoria di farmaci

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

di nuova generazione che hanno mostrato un elevato grado di attività anti-tumorale comprende gli anticorpi monoclonali diretti verso proteine di membrana delle cellule neoplastiche (rituximab, alemtuzumab, CBHQ880), che possono essere marcati con sostanze tossiche (gentuzumab-ozogamicin) o legati a radionuclidi (ibritumomab) per uso in radio-immunoterapia. Questi primi, ma assai incoraggianti risultati, indicano la necessità di un approccio organico e sistematico all'attività di ricerca di tipo traslazionale nel settore emato-oncologico, volta quindi ad applicare in modo integrato alla pratica clinica i risultati della ricerca di base e le nuove piattaforme di tipo tecnologico che derivano dai processi di sviluppo delle aziende che operano nel settore sanitario. Un tale tipo di approccio non può essere sviluppato se non nell'ambito di programmi cooperativi basati sulla definizione di una rete di strutture di eccellenza che operano in settori della ricerca oncologica complementari tra di loro

Risultati e prodotti conseguiti: Nel corso del 2008 l'attività scientifica inerente a questo progetto si è prevalentemente svolta nell'ambito di studi autonomi, multicentrici ed all'interno dei Gruppi Cooperatori Nazionali, con particolare riferimento alle emopatie neoplastiche ed ai tumori solidi. Sono stati conclusi e pubblicati (in particolare su Blood, Journal of Clinical Oncology, Annals of Oncology ed altre riviste internazionali) alcuni studi (e di altri sono stati presentati dati preliminari) riguardanti la valutazione dell'efficacia e della tollerabilità di terapie di prima linea e di salvataggio in pazienti con mieloma multiplo in recidiva o refrattario, con nuovi schemi di trattamento includenti farmaci quali zoledronato, talidomide, bortezomib e lenalidomide, valutandone, in particolare, le loro attività nell'ambito del microambiente midollare e dell'angiogenesi e l'integrazione all'interno di strategie intensive trapiantologiche autologhe e di trapianto allogenico non-mieloablative. Sono state altresì analizzate in maggiore dettaglio alcune specifiche complicanze, quali l'osteonecrosi della mandibola, le patologie trombotiche e la tossicità renale. È stato altresì pubblicato su Cancer uno studio randomizzato multicentrico nazionale, coordinato dal nostro Istituto, che ha testato il significato dell'uso profilattico dello zoledronato (un bifosfonato di terza generazione) in pazienti affetti da mieloma asintomatico. I risultati hanno evidenziato come l'utilizzo di tale farmaco non sia in grado di ridurre la probabilità ed il tempo di evoluzione verso una franca forma di mieloma sintomatico, ma riduca significativamente le complicanze ossee al momento della progressione. Sempre per quel che concerne il mieloma, sono state sviluppate e pubblicate linee guida nazionali sul trattamento di questa patologia, nell'ambito di un panel di esperti Italiani. È infine in corso di pubblicazione su Clinical Cancer Research un'esperienza multicentrica sulla definizione dei parametri clinico-biologici di evoluzione delle gammopatie monoclonali di significato indeterminato.

Nell'ambito delle sindromi mielodisplastiche, sono stati presentati i dati preliminari relativi all'uso dell'azacitidina, un agente ipometilante, nelle diverse fasce di rischio, nel contesto di una survey nazionale, coordinata dal CROB, dei pazienti Italiani sottoposti a tale terapia. I risultati ottenuti hanno evidenziato la tollerabilità e l'efficacia di questo farmaco anche in subsets non convenzionali, quali le forme a basso rischio (il relativo lavoro è stato sottomesso dalla rivista Cancer), singolarmente o in associazione ad altri agenti, quali acido valproico ed acido all-trans retinoico (lavoro sottomesso alla rivista Clinical Cancer Research) o in pazienti con leucemia acuta (manoscritto in preparazione).

Per quel che concerne i linfomi, è stata pubblicata su Haematologica l'esperienza del gruppo Italiano cooperatore GISL sull'incidenza di seconde neoplasie nei pazienti trattati per linfoma non-Hodgkin diffuso a grandi cellule e sono stati presentati dati preliminari relativi all'utilizzo dell'anticorpo monoclonale anti-CD20 radiomarcato (90Y ibritumomab tiuxetan) come condizionamento o consolidamento in procedure di trapianto autologo di cellule staminali in pazienti recidivati. Sono stati anche elaborati (manoscritto in preparazione) dati originali del CROB sul trattamento del linfoma mantellare dell'anziano con la combinazione di ciclofosfamide iperfrazionata, bortezomib ed anticorpo monoclonale anti-CD20. Presentati infine all'ASH 2008 i risultati finali dello studio caso-controllo sul ruolo della terapia antivirale in pazienti con linfoma aggressivo HCV positivi (lavoro in preparazione). Tuttora in corso di valutazione l'utilizzo della PET precoce in pazienti affetti da m. di Hodgkin sottoposti a chemioterapia intensiva con schema BEACOPP e in patologie linfoproliferative non aggressive (linfomi follicolari). Accettati infine sul Journal of Clinical Oncology i dati definitivi di uno studio nazionale randomizzato, sponsorizzato dal Gruppo Italiano Studio Linfomi (GISL), sulla terapia di prima linea nel Linfoma di Hodgkin, che ha evidenziato la superiorità, in termini di sopravvivenza libera da progressione, dello schema BEACOPP nei confronti del trattamento standard ABVD o dello schema COPPEB/CAD, ma anche la più elevata tossicità di tale approccio.

In relazione ad alcune malattie rare, sono state pubblicate esperienze cliniche pluricentriche sul trattamento della leucemia plasmacellulare ed uno studio retrospettivo nazionale sulla mastocitosi sistemica aggressiva.

AGGIORNAMENTO 2009

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Larga parte della produzione scientifica è stata dedicata alla valutazione di dati relativi a trattamenti differenziati e fattori prognostici nel mieloma multiplo, riguardanti, in particolare:

La comparazione, in uno studio randomizzato multicentrico di fase 3 (GIMEMA Myeloma Network) fra due differenti schemi di condizionamento pre-trapianto autologo di cellule staminali periferiche, che ha evidenziato la superiorità dei 200 mg/mq di melphalan rispetto ai 100 mg/mq, in termini di durata di remissione, con tossicità solo moderatamente più severa.

Lefficacia di bortezomib, inibitore del proteasoma, nei pazienti con insufficienza renale.

La dimostrazione del frequente riscontro di amiloide su preparati citologici midollari, con rilevante risvolto clinico in relazione a trattamenti specifici con potenziale neurotossicità.

Gli aspetti farmacologici e terapeutici dell'utilizzo di defibrotide, valutati in una review.

La validazione di un sistema di scoring prognostico per le gammopatie monoclonali di significato indeterminato (MGUS), basato su entità della componente monoclonale, evidenza di catene leggere nelle urine e coinvolgimento delle immunoglobuline non paraproteinemiche per la variante IgG ed emoglobina e livelli di immunoglobuline policlonali per le forme IgA.

La migliore definizione del trattamento di prima linea nei pazienti anziani, con linee guida descritte nell'ambito del Multiple Myeloma Working Party del Gruppo Cooperatore nazionale GIMEMA.

Lefficacia e la tollerabilità di un trattamento sequenziale leukemia-like (induzione, consolidamento, mantenimento) includente i nuovi farmaci (bortezomib e lenalidomide) + una antraciclina, integrati in un programma di doppio autotrapianto ad intensità ridotta in pazienti con età compresa fra i 65 ed i 75 anni.

Nell'ambito della patologia leucemica, sono stati pubblicati dati relativi a:

L'uso di basse dosi di alemtuzumab nella leucemia linfatica cronica refrattaria ad altri trattamenti, che hanno dimostrato lefficacia e la ridotta tossicità di tale approccio terapeutico rispetto alle dosi ed alle schedature standard.

L'utilizzo di un nuovo schema di condizionamento pre-trapianto autologo di cellule staminali periferiche, basato sull'infusione continua di idarubicina e busulfano endovena, nella leucemia mieloide acuta, che riduce notevolmente la possibile variabilità di efficacia correlata alla eterogeneità di assorbimento del busulfano assunto per via orale.

Per quanto concerne le sindromi mielodisplastiche:

È stato fornito un contributo allo studio internazionale randomizzato sulle forme ad alto rischio, che ha dimostrato lefficacia, in termini di significativo miglioramento della sopravvivenza globale, dell'azacitidina, agente ipometilante, rispetto ai trattamenti convenzionali, sia intesi come terapia di supporto, sia come trattamenti attivi alternativi (in particolare ara-c a basse dosi e chemioterapia-AML like).

È stata altresì dimostrata lefficacia della combinazione di azacitidina con acido valproico a dosaggi adeguati, documentando in vivo la sinergia, già dimostrata in vitro, fra un agente ipometilante ed un inibitore dell'istone deacetilasi.

Sono stati pubblicati i risultati definitivi di uno studio retrospettivo che ha evidenziato come i pazienti mielodisplastici trasfusione-dipendenti responsivi ad eritropoietina ricombinante evidenzino un vantaggio di sopravvivenza nei confronti di pazienti con caratteristiche cliniche analoghe, ma non responsivi o mai trattati con tale farmaco.

Sono in corso di pubblicazione le nuove linee guida della Società Italiana di Ematologia, che vedono direttamente coinvolta nella stesura la UO di Ematologia.

Da ultimo, in collaborazione con il GISL (Gruppo Italiano Linfomi), è stato condotto uno studio retrospettivo su oltre 800 pazienti con linfoma non-Hodgkin a grandi cellule B, che ha evidenziato come i modelli prognostici convenzionali (in particolare IPI) siano scarsamente predittivi in era rituximab.

Sono stati inoltre presentati a vari Congressi Nazionali ed Internazionali (SIE, SIES, EHA, ASH) dati preliminari relativi a:

Mieloma Multiplo:

Comparazione doppio trapianto autologo vs sequenza autologo-trapianto allogenico non mieloablativo nel mieloma multiplo (studio internazionale IBMTR).

Studi randomizzati di comparazione fra uno schema a tre farmaci (bortezomib, melphalan e prednisone) verso uno schema a 4 farmaci (includente anche la talidomide) (GIMEMA Myeloma Network) e di melphalan e prednisone vs la stessa

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

combinazione più talidomide (GISL) nei pazienti anziani.

Valutazione della combinazione talidomide, doxorubicina e desametasone in prima linea.

Studio caso-controllo di confronto fra lenalidomide + desametasone vs lenalidomide + melphalan + prednisone (Mayo Clinic/GIMEMA Myeloma Network).

Valutazione degli episodi febbrili in pazienti sottoposti a mobilizzazione di cellule staminali periferiche con filgrastim o lenograstim.

Analisi della malattia minima residua molecolare dopo terapia di consolidamento post-autotrapianto con l'associazione bortezomib, talidomide e desametasone (GIMEMA Myeloma Network).

Valutazione di combinazioni chemioterapiche contenenti bortezomib e studio retrospettivo nazionale epidemiologico e clinico nella leucemia plasmacellulare primitiva (GIMEMA Multiple Myeloma and Acute Leukemias Working Parties).

Sindromi linfoproliferative:

Conclusi due studi retrospettivi sull'utilizzo della bendamustina come agente singolo o in combinazione con rituximab in pazienti con leucemia linfatica cronica o linfomi indolenti in recidiva o refrattari (GISL e IIL).

Effettuata una analisi preliminare del significato prognostico di anomalie citogenetiche e markers molecolari in pazienti con leucemia linfatica cronica in stato iniziale (GISL).

Uso della PET nella stadiazione e nella valutazione prognostica nei linfomi follicolari.

Analisi citofluorimetrica della modulazione dell'antigene CD20 in pazienti con LLC trattati con rituximab,

Uso della combinazione di fludarabina, ciclofosfamide e rituximab in prima linea nei linfomi indolenti non follicolari (GISL).

Valutazione della combinazione di tiotepa, etoposide, citosina arabinoside e melfalan (TEAM) come protocollo di condizionamento per l'autotrapianto nei linfomi.

Sindromi Mielodisplastiche :

Sono stati analizzati i dati prospettici di uno studio nazionale sulla qualità di vita.

È stata condotta una meta-analisi degli studi pubblicati sull'uso della talidomide.

È stato concluso un esteso studio nazionale multicentrico retrospettivo coordinato dall'IRCCS-CROB sull'utilizzo di azacitidina per uso compassionevole in gruppi differenziati di pazienti con basso o elevato rischio IPSS o in fase di trasformazione leucemica.

In fase di conclusione uno studio multicentrico nazionale per la standardizzazione delle tecniche citofluorimetriche per la diagnosi e la valutazione prognostica.

Leucemia mieloide cronica:

Sono in corso di elaborazione i dati relativi a valutazioni retrospettive multicentriche riguardanti le seconde neoplasie ed il follow-up a lungo termine dei pazienti, in particolare in quelli anziani, trattati con dasatinib, un inibitore delle tirosin-kinasi di seconda generazione

Aggiornamento 2010

Larga parte della produzione scientifica è stata dedicata alla valutazione di dati relativi a trattamenti differenziati e fattori prognostici nel mieloma multiplo, riguardanti, in particolare:

La comparazione, in uno studio randomizzato multicentrico di fase 3 (GIMEMA Myeloma Network) fra due differenti schemi di induzione pre-trapianto autologo di cellule staminali periferiche, che ha evidenziato la superiorità della combinazione bortezomib, talidomide e desametasone (VTD), seguita da consolidamento, rispetto a talidomide e desametasone (TD) in termini di percentuale e profondità delle risposte e della durata di remissione.

Analogamente, è stata pubblicata l'evidenza della maggiore efficacia, nei pazienti anziani o non eleggibili per il trapianto autologo, dell'associazione a 4 farmaci di bortezomib, melfalan, talidomide e prednisone rispetto alla combinazione di 3 farmaci (senza bortezomib), in uno studio nazionale randomizzato di fase III

L'efficacia della somministrazione settimanale, rispetto a quella bisettimanale, di bortezomib, inibitore del proteasoma, nei pazienti anziani, con significativa riduzione della tossicità neurologica.

L'importanza di un trattamento di consolidamento post-autotrapianto con una combinazione di bortezomib, talidomide e desametasone nell'indurre una maggior percentuale di remissioni molecolari, che influenza favorevolmente la prognosi.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Gli aspetti globali di efficacia e tossicità dei nuovi farmaci (talidomide, lenalidomide e bortezomib) nel trattamento di prima linea, valutati in una review.

Nell'ambito della patologia leucemica, sono stati pubblicati dati relativi a:

Analisi del fenomeno della modulazione dell'antigene CD20 in pazienti con leucemia linfatica cronica trattati con Rituximab, valutandone i possibili meccanismi patogenetici e le implicazioni cliniche. In particolare, è stata evidenziata una possibile correlazione verso l'evoluzione in linfoma aggressivo (s. di Richter).

Proposta e validazione di un possibile nuovo indice prognostico basato su parametri biologici innovativi in pazienti con leucemia linfatica cronica in fase iniziale.

Analisi retrospettiva multicentrica del trattamento della leucemia promielocitica acuta in pazienti anziani, che ha evidenziato la necessità di una terapia individualizzata in questo subset di pazienti, a causa della frequente presenza di rilevanti comorbidità che possono condizionare significativamente la prognosi. Anche in questa popolazione di pazienti, tuttavia, viene confermata l'elevata efficacia dell'ATRA in combinazione con chemioterapia nei soggetti fit.

Per quanto concerne le sindromi mielodisplastiche:

È stato pubblicato uno studio retrospettivo nazionale sull'uso compassionevole dell'azacitidina nell'ambito delle sindromi mielodisplastiche a basso rischio prognostico, coordinato dall'Istituto, che ha chiarito come tale approccio sia fattibile ed efficace anche in questo setting di pazienti, per i quali il farmaco non ha ancora attualmente indicazione.

È stata effettuata una review sui effetti positivi sulle matopoiesi in pazienti mielodisplastici trattati con deferasirox, chelante orale utilizzato per la prevenzione del sovraccarico marziale post-trasfusionale, ipotizzando alcuni possibili meccanismi biologici.

Sono stati pubblicati i risultati definitivi di uno studio sull'utilizzo di bortezomib, inibitore del proteasoma, che ha dimostrato la sostanziale inefficacia di tale farmaco nelle mielodisplasie, pur evidenziandosi una certa attività sui livelli del marcatore neoplastico WT-1.

Sono state pubblicate le nuove linee guida della Società Italiana di Ematologia per il trattamento delle sindromi mielodisplastiche, che vedono direttamente coinvolta nella stesura la UO di Ematologia dell'Istituto.

Attività previste gli obiettivi saranno mirati sostanzialmente a 4 gruppi di condizioni:

1) Linfomi ed altre sindromi linfoproliferative croniche:

Trattamenti innovativi risk-adapted, con e senza trapianto di cellule staminali, in particolare individualizzati nei linfomi aggressivi e indolenti/follicolari nel giovane e nell'anziano, con utilizzo di nuovi farmaci e nuove schedule ad intensità variabile (bortezomib, bendamustina, lenalidomide, alemtuzumab, antracicline liposomiali) o con anticorpi monoclonali radio-immunoconiugati nei linfomi aggressivi in recidiva ed extranodali, nel consolidamento, con supporto di cellule staminali periferiche, nel post-trapianto autologo, nel condizionamento pre-trapianto.

Utilizzo della PET precoce nel linfoma di Hodgkin, nel linfoma a grandi cellule, nel linfoma follicolare ed in quello mantellare, nonché nelle patologie linfoproliferative atipiche (sarcoïdosi, m. di Castleman, m. Rosai-Dorfman).

Approfondimento delle caratteristiche cliniche, terapeutiche (profilassi e mantenimento/consolidamento antivirale, fattibilità di procedure aggressive e possibilità di riattivazione virale) e molecolari (infezione occulta, profilo di espressione dei microRNA) in pazienti con patologie linfoproliferative e concomitante infezione da HCV o HBV.

2) Mieloma ed altre gammopatie monoclonali:

Valutazione a lungo termine, in termini di efficacia e di tollerabilità, degli effetti dei trattamenti con talidomide, lenalidomide o bortezomib, eventualmente utilizzati in associazione con farmaci convenzionali (melphalan ciclofosfamide) in pazienti anziani, o integrati in strategie terapeutiche finalizzate ad approcci intensivi trapiantologici (autologo ed allogenico), in pazienti giovani, o anche più anziani, ma fit e con favorevole profilo di co-morbidità, ad alto rischio, con mieloma o leucemia plasmacellulare.

Analisi dei dati relativi a studi multicentrici ad ampio follow-up atti a verificare l'efficacia e la safety dei difosfonati in soggetti con mieloma asintomatico, non altrimenti trattati,

Identificazione dei fattori di rischio per progressione nei soggetti con MGUS (gammopatie monoclonali di significato

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

indeterminato).

Trattamenti innovativi per la leucemia plasmacellulare primitiva.

Studi sui fattori prognostici convenzionali, molecolari, citogenetici ed immunofenotipici e della malattia minima residua.

3) Sindromi mielodisplastiche e mieloproliferative, leucosi acute:

Studi multicentrici sullefficacia e la tollerabilità dellazacitidina, farmaco ipometilante, da sola o in associazione ad altre molecole (valproato, ATRA, gentuzumab-ozogamicin) in pazienti con sindromi mielodisplastiche a rischio basso ed elevato e nelle leucemie acute mieloidi dell'anziano non-fit.

Valutazione a lungo termine di efficacia e safety ed effetti su sopravvivenza e qualità di vita dell'uso di fattori di crescita eritroidi e mieloidi (eritropoietina, darbopoietina, G-CSF peghilato, romiplostin) e degli agenti immunomodulanti (talidomide e lenalidomide) nei pazienti con sindromi mielodisplastiche a basso rischio.

Partecipazione al pannello di esperti nazionali per la stesura delle linee guida basate sullevidenza della Società Italiana di Ematologia

Studi immunofenotipici e standardizzazione delle tecniche citofluorimetriche nella diagnostica delle sindromi mielodisplastiche.

Studio retrospettivo sulle leucemie acute therapy related.

Partecipazione a studi finalizzati alla valutazione della qualità di vita dei pazienti.

Nuovi approcci terapeutici alle sindromi mieloproliferative croniche (leucemia mieloide cronica, trombocitemia essenziale, mielofibrosi, sindromi ipereosinofile, mastocitosi sistemica)

4) Identificazione e valutazione del significato clinico di bio-marcatore (molecolari, citogenetici, citofluorimetrici, cinetici e umorali) per la diagnosi, il monitoraggio e la stratificazione prognostica delle emopatie neoplastiche, con particolare riferimento a:

Sindromi mielodisplastiche: analisi di cariotipi complessi e valutazione di lesioni citogenetiche specifiche (del7, 5q-), partecipazione a studi di standardizzazione citofluorimetrica, dosaggio citochine circolanti.

Sindromi linfoproliferative croniche: Valutazione della perdita dell'espressione del CD20 in corso di terapia con rituximab, studio delle principali dosaggio citochine circolanti.

Mieloma e gammopatie monoclonali: angiogenesi, free-light chains, analisi citofluorimetrica della cinetica e di fenotipi atipici plasmacellulari, dosaggio citochine circolanti, studio della malattia minima residua).

Leucemie acute: WT1

Sindromi mieloproliferative croniche: analisi di difetti coagulativi acquisiti, studi molecolari su JAK-2, mutazione esone 12, mpl.

10 : Identificazione e validazione di nuovi biomarcatori prognostici e di previsione di risposta alla terapia post-chirurgica per le principali neoplasie maligne del tratto urogenitale maschile

Responsabile: Vita Giulia Anna Carmen

Programma:

Parole chiave: Carcinoma del tratto uro-genitale, epigenetica, terapia, prognosi

Altri enti coinvolti: Department of Urology and Pathology, Harvard Medical School Boston, U.S.

Anno inizio: 2009

Durata: 24

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Altro

Descrizione: Lavanzamento delle conoscenze dei meccanismi molecolari alla base dell'aggressività biologica dei tumori maligni ci consente attualmente di prospettare istituzione di approcci innovativi di trattamento per una quota considerevole di

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

neoplasie.

In particolare, l'identificazione di nuovi fattori molecolari coinvolti nella deregolazione del turnover cellulare, dell'apoptosi e, per i tumori in fase avanzata, della farmacoresistenza, costituisce il presupposto per ipotizzare trial sperimentali di terapia genica da integrare con quelli attualmente previsti dalla terapia standard.

Questo trend è particolarmente evidente nel campo della patologia oncologica del tratto uro-genitale. È noto infatti che, in questo settore, sono comprese alcune neoplasie che mostrano una continua tendenza all'incremento dell'incidenza, senza una significativa riduzione della mortalità.

In particolar modo, gli sforzi della comunità scientifica sono rivolti all'identificazione di nuovi fattori molecolari prognostici ed eventuali target di terapie molecolari nei carcinomi della prostata, del rene e della vescica. Senza dubbio il carcinoma della prostata occupa il primo posto nella scala di priorità dei ricercatori per quanto riguarda le neoplasie del tratto urogenitale. Esso infatti è il tumore maligno più frequentemente diagnosticato nell'uomo e la seconda causa più frequente di morte per neoplasia nel sesso maschile.

Gli estrogeni sono stati implicati nello sviluppo e nella progressione di questo tumore, e sembrano costituire una strada promettente di terapia alternativa di trattamento. Tuttavia, il ruolo di questi ormoni nel processo di cancerogenesi prostatica è molto complesso, e necessita di approfonditi chiarimenti prima dell'introduzione in terapia di modulatori selettivi dei recettori estrogenici in tandem con la terapia ablativa androgenica.

Il carcinoma della prostata inoltre è caratterizzato dall'accumulo di alterazioni genetiche ed epigenetiche. Le alterazioni epigenetiche appaiono precocemente e dal momento che la sequenza del DNA permane intatta possono considerarsi reversibili terapeutamente.

I meccanismi attraverso i quali le alterazioni epigenetiche appaiono nel processo di cancerogenesi prostatica non sono ancora stati chiariti. In questo studio ci proponiamo di verificare l'esistenza di alterazioni epigenetiche della compattazione cromatinica in una seria selezionata di carcinomi della prostata distribuiti in categorie omogenee per stadio e grado. L'esistenza di tali alterazioni verrà messa in relazione ai parametri noti clinico-patologici di prognosi e ai dati di follow-up dei pazienti, nonché all'espressione dei recettori per estrogeni e androgeni delle singole neoplasie. Il risultato atteso è quello di stabilire il reale peso di ciascuno di questi nuovi parametri molecolari come attendibili indici individuali di previsione prognostica.

In linea con questi obiettivi, ci proponiamo inoltre, in questo studio, di valutare il ruolo delle alterazioni epigenetiche del genoma nell'induzione del comportamento biologico aggressivo del carcinoma della vescica.

Sono ben noti gli effetti che la metilazione del DNA ha sull'evoluzione del cancro della vescica, anche se non è ancora stato stabilito il peso relativo del processo di metilazione, del silenziamento trascrizionale e dell'instabilità cromosomiale nella determinazione dell'evoluzione biologica di tale tumore. È necessario pertanto approfondire gli studi in tal senso, allo scopo di stabilire il reale ruolo prognostico generale e di stratificazione del rischio individuale di ognuno di questi parametri per i pazienti con carcinoma vescicale.

In tali pazienti verrà inoltre valutato il livello tissutale di espressione dei principali fattori angiogenetici, dal momento che i primi dati della letteratura internazionale suggeriscono il loro possibile ruolo di bersaglio di terapia molecolare in sottogruppi selezionati di pazienti con carcinoma vescicale.

Per quanto riguarda il carcinoma a cellule renali, è noto che circa un terzo dei pazienti trattati chirurgicamente per carcinoma localizzato è destinato a sviluppare malattia metastatica. L'identificazione di questi pazienti ad alto rischio rimane il fattore critico per impostare efficaci protocolli personalizzati di follow-up e per l'istituzione della più appropriata terapia sistemica adiuvante.

Tradizionalmente, il TNM è il fattore principalmente utilizzato per la previsione prognostica di questi pazienti. Tuttavia, i sistemi di stadiazione e grading esistenti continuano a fornire informazioni prognostiche limitate, soprattutto perché i vari sottogruppi di neoplasie attualmente identificabili comprendono lesioni eterogenee dal punto di vista cellulare e molecolare. È indispensabile incorporare negli attuali fattori prognostici nuovi parametri da inserire in articolati algoritmi con più elevata potenzialità prognostica.

Recentemente, un ruolo di rilievo in tal senso è stato ipotizzato per alcune molecole coinvolte nella regolazione della proliferazione cellulare e della neoangiogenesi. Ad esempio, è stato proposto l'utilizzo di inibitori di VEGF, VEGFR, EGFR, in associazione a mono- o polichemioterapia e/o terapia con citochine, per pazienti con carcinoma avanzato del rene.

Attualmente tuttavia il principale fattore avverso per la risposta terapeutica post-chirurgica dei pazienti con carcinoma a cellule renali è costituito dalla nota farmaco-resistenza di tale tumore. Ci proponiamo, in questo studio, di approfondire le conoscenze dei meccanismi molecolari di induzione della farmaco-resistenza del carcinoma a cellule renali.

L'obiettivo finale del presente progetto è quello di contribuire al raggiungimento di un approccio multidisciplinare avanzato di terapia, che tenga conto, oltre che degli aspetti chirurgici, clinici ed istologici, anche dei parametri biologici individuali di ciascun tipo di tumore, per ogni singolo paziente.

Solo questo tipo di strategia sarà in grado di assicurare un significativo miglioramento della prognosi dei pazienti con carcinoma della prostata, della vescica e del

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Risultati e prodotti conseguiti: Nel corso del primo anno lo sviluppo del progetto si è svolto coerentemente a quanto previsto nel programma di ricerca. In particolare, allo scopo di identificare e validare nuovi biomarcatori prognostici e di previsione di risposta alla terapia post-chirurgica per le principali neoplasie del tratto uro-genitale maschile, si è approfondito il ruolo del Fattore 1 di Aggregazione Cromatinica (CAF-1) come nuovo fattore di previsione prognostica in una popolazione selezionata di pazienti con adenocarcinoma prostatico. CAF-1 è un chaperone di istoni, costituito da tre subunità proteiche p48, p60 e p150, che recenti studi sperimentali indicano come uno dei più efficienti regolatori del normale processo di replicazione cellulare e del DNA-repair ad esso connesso. In particolare, la subunità proteica CAF-1/p60 è stata proposta come un sensibile marker di proliferazione cellulare con elevato valore predittivo prognostico in diverse neoplasie solide umane. L'espressione di CAF-1/p60 è stata valutata mediante tecniche di immunistochemica su campioni paraffinati, in una popolazione selezionata di 55 adenocarcinomi prostatici, di differente grado e stadio patologico e di Western Blotting su un numero inferiore di campioni freschi congelati. Si è proceduto, in primo luogo, alla raccolta ed alla caratterizzazione dei campioni di prostatectomia radicale, acquisiti dagli archivi del Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali dell'Università Federico II di Napoli, con disponibilità dei dati completi di follow-up dei singoli pazienti, relativi ad un periodo non inferiore a due anni dall'intervento chirurgico, poi si è effettuata la revisione dei preparati d'archivio, per la conferma della diagnosi istologica del grading valutato mediante Gleason score combinato e dello staging sec.TNM di ogni singolo caso. I dati clinici, anamnestici e di follow-up dei pazienti ed i dati relativi alla valutazione morfologica ed immunistochemica relativi ai singoli pazienti sono stati riportati in un unico database. Per ogni caso selezionato, un'inclusione paraffinata rappresentativa della neoplasia è stata scelta ed utilizzata per ottenere sezioni seriate da 4 micron, poi montate su vetrini pretrattati con poli-L-lisina. Dopo una preincubazione in forno a microonde per ottenere un opportuno smascheramento antigenico, è stata effettuata l'incubazione delle sezioni con l'anticorpo primario. Successivamente, si è proceduto a completamento della metodica standard LSAB-perossidasi. La positività immunistochemica dei singoli casi è stata valutata semiquantitativamente, indipendentemente da due osservatori in doppio cieco, secondo una scala arbitraria compresa fra 0 (assenza di positività) e +++ (intensa positività). Adeguate procedure statistiche sono state, poi, utilizzate allo scopo di correlare i risultati istologico-fenotipici con i dati clinici del paziente e con quelli della sopravvivenza (globale e libera da malattia). Nella nostra casistica, l'overespressione di CAF-1/p60 caratterizza i casi di adenocarcinoma prostatico a cattiva prognosi, a prescindere dal grading e dallo stadio patologico. Attualmente ed analogamente a quanto già fatto per il carcinoma prostatico, si sta procedendo all'acquisizione dagli archivi dell'Unità di Anatomia Patologica dell'IRCCS Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata (CROB) e del Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali dell'Università Federico II di Napoli di casi con disponibilità di dati completi di follow-up, per la costituzione di una casistica selezionata di neoplasie vescicali e renali da sottoporre a valutazione con nuovi, possibili biomarcatori prognostici.

AGGIORNAMENTO 2010

È stato completato l'allestimento della casistica di tessuti paraffinati prostatici, relativi a IBP (50 casi), PIN/ASAP (40 casi) e carcinoma prostatico (60 casi, suddivisi in 3 gruppi di 20 casi, rispettivamente con grado istologico di Gleason basso, intermedio ed alto).

Per tutti i casi sono stati registrati i dati anagrafici dei pazienti, unitamente a quelli clinico-patologici e di follow-up (clinico, strumentale e/o istologico).

Da ogni inclusione di tessuto paraffinato sono state tagliate sezioni seriate di 4 micron, successivamente montate su vetrini pretrattati per immunistochemica e lasciate asciugare in stufa a secco per 5 ore.

Sull'intera casistica, è stata quindi effettuata, così come previsto dal Progetto, colorazione immunistochemica con anticorpi commerciali anti-CAF-1 p60, CAF-1 p150, PARP-1, ki67(MIB-1), PCNA.

Come è noto, le proteine del complesso CAF-1 sono direttamente coinvolte nel controllo della compattazione della cromatina nucleare, strettamente legato alla regolazione della proliferazione cellulare e del DNA-repair ad essa correlato. Un'alterazione dell'espressione di queste proteine causa una proliferazione cellulare continua ed incontrollata. Quando questo fenomeno si associa ad una iperstimolazione dei processi di DNA repair, si raggiungono livelli elevatissimi di espansione di un compartimento proliferativo cellulare neoplastico particolarmente resistente alla maggior parte delle terapie tradizionali, soprattutto per la sua acquisita abilità di autoriparazione continua dei frequenti danni proliferazione-associati del DNA.

I dati fin qui emersi relativi alle 2 proteine CAF-1 nella nostra serie di casi, hanno evidenziato una sensibile deregolazione della loro espressione, con un trend di crescita progressiva dall'IBP alle lesioni preneoplastiche ed ai carcinomi prostatici. Abbiamo inoltre riscontrato una chiara alterazione dell'espressione di PARP-1, polimerasi fondamentale sia nella regolazione della morte cellulare per apoptosi che nella riparazione dei danni al DNA, in una significativa percentuale di

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

carcinomi prostatici, con un apparente trend di correlazione con la perdita di differenziazione cellulare.

Questi risultati sono attualmente in fase di valutazione statistica, per la validazione definitiva. Se verrà confermata la correlazione fra espressione alterata di proteine CAF-1, PARP-1, dedifferenziazione e/o cattiva prognosi dei singoli casi di carcinoma prostatico, si potrà ipotizzare un nuovo algoritmo predittivo di prognosi da affiancare alla diagnosi routinaria istopatologica. In altri termini, si potrà configurare un ipotetico scenario biomolecolare caratteristico dei casi più aggressivi di carcinoma prostatico, definibile sulla base della dimostrata deregolazione di due fra i più diffusi ed efficienti checkpoint di controllo della proliferazione cellulare e del DNA-repair.

La fase successiva prevede sia la valutazione delle residue molecole legate ai pathways di riparazione ai danni del DNA e delle proteine coinvolte nella regolazione epigenetica dell'assemblaggio cromatinico e della proliferazione cellulare mediante indagine immunocitochimica, sia la conferma dei dati ottenuti mediante biologia molecolare, allo scopo di approfondire i meccanismi patogenetici molecolari connessi alla cancerogenesi prostatica.

Attività previste Identificare e validare nuovi biomarcatori prognostici e di previsione di risposta alla terapia post-chirurgica per le principali neoplasie del tratto uro-genitale maschile- Acquisizione dagli archivi dell'Unità di Anatomia Patologica dell'IRCCS Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata (CROB) e del Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali dell'Università Federico II di Napoli-

Il prossimo obiettivo dello studio si prefigge di arruolare 100 donne sane, non affette da patologie oncologiche e cardiovascolari, e 100 donne in terapia con tamoxifene per patologia pregressa mammaria. per verificare l'efficacia preventiva della metformina, assieme ad una corretta alimentazione, nel contrasto del cancro allendometrio e di malattie cardiache. Sappiamo che le donne che hanno nel sangue più alti livelli di insulina e di ormoni sessuali si ammalano di più. Anche le donne obese o in sovrappeso si ammalano di più (dopo la menopausa), così come le donne diabetiche o con squilibri metabolici come glicemia alta, trigliceridi alti, pressione alta, e bassi livelli di colesterolo buono, condizioni che definiscono la cosiddetta sindrome metabolica. Migliorare l'alimentazione ed aumentare l'attività fisica migliorano queste condizioni, ma ci sono sempre più indizi che la metformina, possa ridurre il rischio di ammalarsi di cancro dell'endometrio.

Il primo obiettivo del progetto è di studiare l'effetto della metformina, somministrata per 5 anni, sull'insorgenza dei tumori allendometrio in donne sane ed in pazienti in terapia con tamoxifene per patologia pregressa mammaria. Lo studio sarà condotto con la collaborazione di donne a più elevato rischio tumore per età (dovranno essere in menopausa, tra i 50 e i 74 anni) e presenza di componenti di sindrome metabolica, una condizione predisponente al diabete di tipo 2. Dovranno prendere quotidianamente due pillole, che per metà delle partecipanti, scelte in modo rigorosamente casuale, conterranno metformina, e per metà saranno senza farmaco (placebo).

Il secondo obiettivo dello studio è di valutare l'effetto della metformina sulla insorgenza di malattie cardiovascolari nelle donne, includendo in questa definizione malattie cardiache e ictus cerebrale. Poiché la patologia cardiovascolare rappresenta la causa principale di morte nelle donne e poiché sia il tumore allendometrio e sia le malattie cardiovascolari condividono nel diabete di tipo 2 un fattore di rischio importante, lo studio proposto include le malattie cardiovascolari come secondo obiettivo di prevenzione. In questo caso, l'ipotesi di studio è che le donne a cui sarà somministrata metformina osserveranno una minore frequenza di malattie cardiovascolari rispetto alle donne che faranno uso del placebo durante i cinque anni di conduzione dello studio. Una volta all'anno le donne saranno sorvegliate con visita cardiologica, ECG ed ecocardiografia, visita ginecologica, Paptest ed ecografia TV, eventualmente isteroscopia con biopsia dell'endometrio se clinicamente indicato.

Lo studio sarà in cieco cioè le partecipanti e gli operatori non saranno a conoscenza di chi sta prendendo il farmaco e chi il placebo, ma l'informazione sarà sempre disponibile al medico curante che ritenesse di farne richiesta.

A tutte le partecipanti verranno anche date raccomandazioni alimentari, e un sottogruppo verrà anche aiutato a cambiare dieta partecipando a corsi di cucina. Complessivamente lo studio richiederà la collaborazione di 100 donne sane, non affette cioè da patologia oncologica e cardiovascolare e 100 donne in terapia con tamoxifene per patologia pregressa mammaria.

11 : Ruolo del pathway TRAP1/HSP90 nella resistenza farmacologica dei tumori umani

Responsabile: Vita Giulia Anna Carmen

Programma:

Parole chiave: farmaco-resistenza, tumori del colon, tumori della mammella, apoptosi, mitocondrio

Altri enti coinvolti: Università degli Studi di Foggia; Università degli Studi di Napoli Federico II

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Anno inizio: 2010

Durata: 24

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Altro

Descrizione: La resistenza ai farmaci è la principale causa di fallimento dei trattamenti antitumorali. Il nostro gruppo di ricerca è coinvolto nello studio dei meccanismi molecolari coinvolti nella resistenza ai trattamenti tumorali che agiscono inducendo apoptosi. È ampiamente dimostrato che una delle principali cause di farmaco-resistenza nei tumori è rappresentato dalla attivazione di meccanismi che favoriscono l'adattamento della cellula tumorale a sopravvivere in presenza di condizioni ambientali sfavorevoli, tra cui elevate concentrazioni di agenti farmacologici che hanno come obiettivo la morte della cellula tumorale stessa. Il nostro gruppo di ricerca ha contribuito a studiare il ruolo di TRAP1, una proteina mitocondriale ad azione antiapoptica e nota per essere un partner di HSP90 nella regolazione del poro mitocondriale, nel favorire un fenotipo resistente all'apoptosi nei tumori umani. In particolare, abbiamo osservato che l'up-regolazione di TRAP1 comporta resistenza ai danni al DNA e all'apoptosi in risposta a trattamenti con cisplatino o altri farmaci antitumorali. Inoltre, abbiamo dimostrato che TRAP1 ed il suo interattore Sorcina, un'altra proteina coinvolta nella farmaco-resistenza, sono co-upregolati nei carcinomi del colon-retto umani e sono coinvolti nell'induzione di un fenotipo cellulare resistente a molteplici chemioterapici. In particolare TRAP1 svolge un ruolo fondamentale nel regolare il folding delle proteine a livello dell'interfaccia reticolo endoplasmico/mitocondrio e nel prevenire lo stress del reticolo ed in questo processo l'interazione con sorcina è cruciale per garantire l'omeostasi del calcio a livello reticolare e mitocondriale. È di potenziale interesse clinico l'osservazione che l'inibizione farmacologica della via metabolica di TRAP1/HSP90 ristabilisce la sensibilità ai farmaci in cellule di carcinoma del colon-retto farmaco-resistenti, osservazione che suggerisce che strategie terapeutiche anti-TRAP1 possano essere utili per bypassare la farmaco-resistenza e per potenziare l'efficacia delle più comuni terapie antitumorali.

Risultati e prodotti conseguiti:

Attività previste

1. Caratterizzazione di TRAP1 come marcatore di resistenza e di prognosi nel carcinoma del colon-retto, dell'ovaio e della mammella.
2. Caratterizzazione del ruolo di TRAP1 nella resistenza ai farmaci a bersaglio molecolare che inibiscono il signaling dell'EGF nel carcinoma del colon-retto e dei farmaci a bersaglio molecolare che inibiscono il signaling dell'HER2 nel carcinoma della mammella.
3. Caratterizzazione e sviluppo preclinico di inibitori di TRAP1.

Lo studio propone di valutare i livelli di espressione di TRAP1 quale marcatore di prognosi e di resistenza ai farmaci in una casistica di circa 150 carcinomi del colon-retto umani in fase avanzata. Tale valutazione ha un razionale in recenti evidenze ottenute dal nostro gruppo su una casistica di 200 carcinomi ovarici che dimostrano che l'espressione di TRAP1 è un fattore prognostico indipendente nei tumori ovarici in stadio FIGO I e III. Sulla base di tale osservazione analizzeremo il ruolo prognostico di TRAP1 nel carcinoma del colon-retto in relazione ai principali parametri clinici ed anatomico-patologici e valuteremo il suo ruolo come marker di resistenza ai farmaci antitumorali. I tumori del colon-retto saranno forniti dalle U.O. di Anatomia Patologica dell'IRCCS di Rionero in Vulture e dell'Università degli Studi di Foggia. Tale caratterizzazione sarà estesa in una seconda fase al carcinoma mammario HER2-positivo.

Il progetto di ricerca prevede inoltre lo studio, mediante tecniche di biologia cellulare e molecolare, del ruolo di TRAP1 nella resistenza agli inibitori dell'EGFR1 in linee cellulari di carcinoma del colon e dell'HER2 in cellule di carcinoma della mammella. Tale studio partirà dall'analisi del signaling dell'EGFR1 e del recettore HER2 come potenziale vie responsabili della modulazione dell'espressione di TRAP1 in linee cellulari tumorali umane. Tale regolazione verrà quindi studiata come potenziale meccanismo utilizzato dalla cellula neoplastica per favorire, mediante il signaling dei recettori tirosin-chinasici di membrana, la sopravvivenza in risposta a condizioni di stress e per evitare l'attivazione della morte cellulare programmata. Infine l'inibizione dell'espressione e/o dell'attività di TRAP1 ed di HSP90 verrà studiata in linee cellulari umane ed in modelli animali come strumento terapeutico per bypassare la farmaco-resistenza e per potenziare l'efficacia di farmaci antitumorali tradizionali e di farmaci a bersaglio molecolare.

12 : Ruolo dell'S100A13 nel fenotipo angiogenetico dei tumori umani

Responsabile: Vita Giulia Anna Carmen

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Programma:

Parole chiave: angiogenesi, melanoma, S100A13, FGF1, VEGF-A, prognosi

Altri enti coinvolti: Università degli Studi di Foggia; Università degli Studi di Firenze; Università degli Studi di Siena; Maine Medical Center Research Institute, Scarborough, MA, USA

Anno inizio: 2011

Durata: 12

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Altro

Descrizione: L'angiogenesi consiste nella formazione di nuovi capillari a partire da vasi pre-esistenti ed è un processo critico in numerose patologie umane tra cui l'aterosclerosi, l'infiammazione cronica ed il cancro. È stato dimostrato che la crescita, l'invasività e la metastatizzazione tumorale sono processi che richiedono l'attivazione dell'angiogenesi e che l'inibizione dell'angiogenesi può rappresentare una strategia terapeutica efficace nella cura dei tumori. L'FGF1 e 2 sono i prototipi di una ampia famiglia di fattori di crescita coinvolti nella formazione del mesoderma, nella neurogenesi e nell'angiogenesi. Gli FGF hanno un'attività sinergica con il VEGF nella patogenesi di numerosi tumori umani quali il carcinoma di mammella, prostata, pancreas, polmone, colon e nel melanoma. Entrambi i prototipi degli FGF sono caratterizzati dall'assenza della sequenza segnale che permette la secrezione attraverso l'apparato di Golgi, ma sono comunque secreti attraverso meccanismi alternativi. Numerosi studi hanno dimostrato che l'FGF1, ma non l'FGF2, è secreto in risposta a condizioni di stress quali lo shock termico, l'ipossia e la deprivazione di siero. L'S100A13, un membro della famiglia di proteine S100 caratterizzate dalla capacità di legare il calcio, svolge un ruolo fondamentale nel processo di secrezione dell'FGF1 in quanto ne facilita il rilascio da parte della cellula. Recenti osservazioni del nostro gruppo hanno evidenziato che l'espressione dell'S100A13 è up-regolata nei tumori cerebrali umani di origine gliale e nei melanomi e che tale espressione correla con il fenotipo angiogenetico. Tali evidenze suggeriscono che l'S100A13 potrebbe essere un marcatore prognostico in quanto espressione della capacità angiogenetica, invasiva e metastatica dei tumori. Sulla base di tale evidenza il presente progetto ha come obiettivo lo studio del ruolo prognostico dell'S100A13 nei melanomi umani.

Risultati e prodotti conseguiti: Pubblicazioni 2010

1. Mandinova, S. Bellum, C. Bagalà, R. Soldi, I. Graziani, M. Landriscina, F. Tarantini, I. Prudovsky, T. Maciag S100A13 mediates the Cu²⁺-dependent stress-induced release of IL-1β and IL-6 from both human U937 and NIH 3T3 cells. *Journal of Cell Science*, 116, 2687-2696, 2003. I.F. 6.83
2. M. Landriscina, G. Schinzari, G. Di Leonardo, M. Quirino, A. Cassano, L. Lauriola, E. D'Argento, M. Scerrati and C. Barone. S100A13, a New Marker of Angiogenesis in Human Neuroectodermal Brain Tumors. *Journal of Neuro-oncology*, 80(3):251-9. 2006 I.F.: 1.85
3. Prudovsky I, Tarantini F, Landriscina M, Neivandt D, Soldi R, Kirov A, Small D, Kathir KM, Rajalingam D, Kumar TK. Secretion without Golgi. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(5):1327-1343, 2008 I.F. 3.381
4. C. Di Serio, L. Doria, S. Pellerito, I. Prudovsky, D. Massi, M. Landriscina, N. Marchionni, G. Masotti, F. Tarantini. The release of Fibroblast Growth Factor-1 from melanoma cells requires copper ions and is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt intracellular signalling pathway. *Cancer Letters*, 267(1):67-74, 2008 I.F. 3,398
5. I. Graziani, A. Doyle, S. Sterling, A. Kirov; F. Tarantini, M. Landriscina, T.K. Kumar, D. Neivandt, I. Prudovsky. Protein folding does not prevent the non-classical export of FGF1 and S100A13. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(3):350-4, 2009 I.F. 2.749
6. M. Landriscina*, D. Massi*, A. Piscazzi, E. Cosci, A. Kirov, M. Paglierani, C. Di Serio, V. Mourmouras, S. Fumagalli, M. Biagioli, I. Prudovsky, C. Miracco, M. Santucci, N. Marchionni, F. Tarantini. (equal contribution) S100A13 is a new angiogenic marker in human melanoma. *Modern Pathology*, 23(6):804-13, 2010 I.F. 4.678

Attività previste Il progetto prevede lo studio di una casistica di circa 100 melanomi umani con uno spessore < 2 cm con il fine di caratterizzare l'S100A13 come marcatore di recidiva. Lo studio prevede la valutazione dei livelli di S100A13 in circa 50 melanomi (spessore < 2 cm) recidivati ed in un'altra casistica di ulteriori 50 melanomi non recidivati con simili caratteristiche cliniche ed anatomopatologiche e sottoposti ad adeguato follow up. I materiali biologici verranno forniti dalle U.O. di Anatomia Patologica delle Università di Siena e Firenze. La valutazione dell'S100A13 verrà effettuata mediante immunistochimica su sezioni

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

paraffinate e mediante Real Time PCR su RNA estratti da campioni tumorali e di cute sana peritumorale paraffinati. I livelli di messaggero e proteina per IS100A13 verranno confrontati con i principali caratteri clinici ed anatomopatologici della casistica in studio. In particolare, sulla base di precedenti evidenze che suggeriscono una maggiore espressione dell'S100A13 nei melanomi a crescita verticale rispetto a quelli a crescita radiale, lo studio si propone di caratterizzare l'espressione dell'S100A13 come marcatore di recidiva in questo sottogruppo di melanomi

13 : Espressione, stato mutazionale e possibili meccanismi di inibizione di EphA3 e ROS1 in neoplasie solide ed ematologiche.

Responsabile: Musto Pellegrino

Programma:

Parole chiave:

Altri enti coinvolti: Onco-ematologia molecolare Università Torino-Orbassano

Anno inizio: 2010

Durata: 24

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Altro

Descrizione: Un meccanismo patogenetico comune a tutte le neoplasie, incluse le malattie ematologiche, è rappresentato da un difetto nella proliferazione cellulare sostenuto da diverse anomalie delle vie di trasduzione del segnale. Alcune classi di proteine che regolano il segnale intracellulare sono più frequentemente il bersaglio di mutazioni geniche o di traslocazioni cromosomiche rispetto ad altre. 1

Un esempio è rappresentato dai recettori tirosino-chinasici (RTKs). Quando mutati o alterati strutturalmente i recettori TK possono diventare delle onco-proteine in grado di indurre la trasformazione e di sostenere il clone leucemico. 2

I geni che codificano per proteine ad attività TK sono frequentemente mutate, traslocate o iperespresse nelle malattie ematologiche sia linfoproliferative che mieloproliferative così come nei tumori solidi.

Lesempio più caratterizzato e più studiato è rappresentato dalla traslocazione di Bcr-Abl che, inducendo l'attivazione costitutiva della TK Abl, è in grado di indurre la trasformazione leucemica nella leucemia mieloide cronica. Altri esempi sono rappresentati dalla mutazione di JAK2 V617F o dalle traslocazioni di PDGF $t(9;22)(q34;q11)$; e $t(8;21)(q24;q22)$; e FGFR1 nelle malattie mieloproliferative Ph negative.3

Sebbene si conoscano molti difetti alla base delle malattie linfocitarie e mieloproliferative, per la maggior parte di queste manca un bersaglio ottimale per una terapia molecolare mirata.

Attualmente sono in fase di sperimentazione clinica diversi inibitori di JAK2 nei pazienti affetti da MPN PH negative, tuttavia, sebbene i risultati clinici siano incoraggianti questi sembrerebbero principalmente legati a una riduzione del volume splenico e a un netto miglioramento della sintomatologia. Il limite di questi farmaci è che non sembrerebbero in grado di ridurre la quantità di allele JAK2 mutato e quindi i sostanza di eradicare la malattia.4 Questo apre la prospettiva di combinazione degli inibitori di JAK2 con ulteriori farmaci diretti contro diversi bersagli.

Il recettore delle efrine EphA3 appartiene a una grande famiglia (Ephs) di TK attivate dal legame con il ligando, le efrine. 5,6 Esistono due sottogruppi di recettori per le efrine, i recettori di classe A e di classe B classificati in base al grado di affinità per le efrine di classe A o B.

I recettori EphA sono espressi durante determinate fasi dello sviluppo embrionale e in particolari tessuti dove regolano lo sviluppo in modo altamente specifico. Inizialmente i recettori EphA3 sono stati caratterizzati per il ruolo nello sviluppo neuronale e nella plasticità sinaptica. Si è poi scoperto l'importante funzione nel regolare molti processi biologici inclusi la proliferazione, l'angiogenesi, l'adesione cellulare e il cross talk cellula-cellula.7,8 Esistono ad oggi numerosi studi che evidenziano il ruolo centrale giocato dai recettori EphA3 nel cancro, soprattutto negli stadi avanzati di malattia. 9

Molti dati suggeriscono che i recettori EphA3 sono iperespressi in diversi tumori solidi inclusi il melanoma, il carcinoma della prostata, gastrico, del colon retto e nel carcinoma mammario. Infine, l'iperespressione di EphA è stata dimostrata in diverse linee cellulari tumorali e leucemiche. Inoltre la presenza di mutazioni di EphA3 rappresenterebbe un ulteriore meccanismo di attivazione del recettore in alcuni tipi di tumore quali il carcinoma del colon, il melanoma e il tumore pancreatico. Tuttavia, molti studi dimostrano come la sola iperespressione del recettore sia di per sé sufficiente a indurre un'abnorme attivazione del

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

segnale mediato da EphA con conseguente trasformazione neoplastica. 10,11

Il recettore EphA3 non è normalmente presente nei tessuti adulti sani. Recentemente abbiamo studiato l'espressione del recettore EphA3 nelle malattie mieloproliferative croniche Philadelphia negative (MPN), nella leucemia mieloide cronica (CML) e nelle leucemie acute mieloidi (AML). Il nostro studio dimostra che il gene EphA3 è significativamente iperespresso nelle malattie mieloproliferative croniche sia Ph negative che positive. I livelli più elevati di proteina sono stati evidenziati nei campioni provenienti da pazienti affetti da Leucemia mielomonocitica Cronica (CMML) e da mielofibrosi idiopatica (PMF). Liperespressione avviene anche a livello proteico e la proteina appare altamente fosforilata in tutti i campioni che presentano liperespressione del gene.

Inoltre abbiamo confermato che i campioni provenienti da donatori sani, sono negative per l'espressione di EphA3. Un dato importante al fine di una terapia molecolarmente mirata è stata inoltre la dimostrazione che il gene e la proteina EphA3 sono molto espressi nei progenitori emopoietici CD34+ di pazienti affetti da leucemie acute e croniche ma non nella controparte normale. Abbiamo inoltre indagato la presenza di mutazioni di EphA3 osservando che, almeno nei pazienti analizzati, la sequenza codificante non presentava anomalie. Questo ci ha permesso di concludere che nelle malattie mieloproliferative croniche liperespressione è verosimilmente il meccanismo che porta all'attivazione di tale recettore.

Infine, esperimenti eseguiti al fine di comprendere le conseguenze dell'abnorme attivazione di EphA3 suggeriscono che questa induca proliferazione e perdita di adesione cellulare e inibizione dell'attività clonogenica.

Basandosi su questi risultati è stato prodotto un anticorpo monoclonale (KB004; Kalobios, California, USA) diretto contro il recettore EphA3 per utilizzo clinico. Dati ancora non pubblicati dimostrano che l'anticorpo è in grado di indurre una potente apoptosi sulle cellule CD34+ di pazienti affetti da LAM, da LMC resistenti alla terapia con inibitori di tirosina chinasi inclusi i pazienti che presentano la mutazione T315I che conferisce resistenza a tutti gli inibitori TK di prima e seconda generazione. L'anticorpo inoltre induce in vitro una potente inibizione della capacità clonogenica e inibizione dei progenitori più immaturi LTC-IC (long term culture initiating cells). 12

Il trial clinico di fase I è in via di attivazione presso LMD Anderson Cancer Institute , Houston, TX.

Infine, un ulteriore importante bersaglio potrebbe essere rappresentato dal recettore TK ROS1.13

Il gene ROS1 è localizzato sul cromosoma 6q16, una regione spesso interessata da traslocazioni o delezioni, e codifica per un recettore TK orfano. Il ruolo fisiologico di ROS1 non è completamente chiaro ma sembrerebbe fondamentale per lo sviluppo. Come EphA3 è espresso durante l'embriogenesi in tessuti ben definiti. I tessuti adulti sani perdono l'espressione di tale gene che, al contrario, sembrerebbe riapparire durante la trasformazione neoplastica.14 La presenza di traslocazioni coinvolgenti ROS1 sono state descritte nei tumori cerebrali dove ritroviamo il gene ibrido FIG-ROS o nei tumori non a piccole cellule del polmone (NSCLC). Liperespressione della chinasi sembrerebbe non limitarsi ai tumori cerebrali (è descritta nel 55% dei meningiomi e 56 % dei glioblastomi) ma, alcuni dati preliminari suggeriscono anche nei tumori intestinali, renali, nel tumore della mammella e in diversi istotipi di tumori polmonari e delle vie biliari. 15

Il nostro studio precedente ha chiaramente dimostrato che ROS1 è iperespresso nel 70% delle leucemie mielomonocitiche croniche (CMML) e nel 50% dei casi di mielofibrosi (PMF). 16

Nelle cellule di sangue midollare e periferico dei pazienti affetti da CMML e PMF la proteina è iperespressa e costitutivamente fosforilata. 16

Come per EphA3 anche ROS1 non è espresso nei campioni di BM e PB ottenuti da donatori sani. ROS1 è espresso preferenzialmente nel compartimento dei progenitori CD34+ di CMML e PMF ma non nella controparte normale. L'analisi di sequenza del promotore e del domain TK non ha evidenziato nei casi analizzati la presenza di mutazioni.

Infine abbiamo dimostrato che liperespressione di ROS1 induce proliferazione, perdita di adesione cellulare e protezione dall'apoptosi attraverso un pathway mediato da SOS/Greb2 e dall'attivazione di Erk e Akt. 16

Anche per ROS1, come per EphA3 sono state disegnate delle sostanze in grado di inibire in modo selettivo ROS1. Si tratta piccole sostanze sintetiche che agiscono bloccando la tasca per il legame all'ATP delle proteina.

Bibliografia

- 1) Hunter T, Middlemas DA, Tracy S, van de Geer P. Receptor protein-tyrosine kinases and phosphatases. Cold Spring Harb Symp Quant Biol.1992;57:25-41.
- 2) van de Geer P, Hunter T, Lindberg RA . Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. Ann Rev Cell Biol. 1994;10: 251-337.
- 3) Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 365:1054-1061, 2005
- 4) Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. N Engl J Med. 2010 ; 363:1117-27.
- 5) Dodelet VC, Pasquale EB. Eph receptors and ephrin ligands:embryogenesis to umorigenesis. Oncogene.2000;19:5614-5619.
- 6) Kullander K and Klein R. Mechanisms and functions of Eph and Ephrin signalling. Nat Rev Molecular Cell Biology.2002;3:

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

475-486.

7) Bohme B, VandenBos T, Ceretti DP et al. Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored ligand LERK-2 to the EPH-related receptor human embryonal kinase 2 promotes tyrosine kinase activity. *J Biol Chem.* 1996;271:247-52.

8) Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature.* 1999;400:77-81.

9) Surawska H, Ma PC, Salgia R. The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:419-433.

10) Bardelli A, Parsons DW, Silliman N, et al. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science.* 2003;300: 949.

11) Balakrishnan A, Bleeker FE, Lamba S, et al.. Novel somatic and germline mutations in cancer candidate genes in glioblastoma, melanoma, and pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 2007 ;67:3545-50

12) Palath V, Vekhande R, Baer M, et al. A Recombinant Antibody to EphA3 with Pro-Apoptotic and Enhanced ADCC Activity Against Various Hematologic Malignancies Shows Selective Inhibition of Colony Formation From Long-Term Culture-Initiating Cells (LTC-ICs) In Primary Leukemia Samples. *Blood* 2010 suppl. 116: 2897

13) Chen, J., Tong, J., Tanaka-Sukegawa, I., Wang, L.H. Cloning and functional characterization of the chicken c-ros promoter. *Cell Growth Differ* 1995; 12,1523-1530.

14) Birchmeier, C., O'Neill, K., Riggs, M., Wigler, M. (1990) Characterization of ROS1 cDNA from a human glioblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 4799-4803. Bishop, J.M. (1985) *Viral Oncogenes.* Cell 42, 2328.

15) Watkins, D., Dion, F., Poisson, M., Delattre, J.Y., Rouleau, G.A. (1994) Analysis of oncogene expression in primary human gliomas: Evidence for increased expression of the ROS oncogene. *Cancer Genet Cytogenet* 72,130-136.

16) Cilloni D, Carturan S, Bracco E, et al. ROS1, the ortholog of drosophila sevenless, represents new molecular defect in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). Manuscript submitted

Risultati e prodotti Il progetto è stato attivato a fine 2010
conseguiti:

Attività previste Valutazione dell'espressione di EphA3 e ROS1 a livello di mRNA e di proteina su una casistica ampia di pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta, sia pH positive che negative, malattie linfoproliferative croniche incluse leucemia linfatica cronica (CLL), mielomi e linfomi.

La quantificazione dell'espressione del trascritto di EphA3 e ROS1 verrà eseguita mediante Real Time PCR secondo le metodiche già utilizzate in precedenza con specifici set di primers e probe su una casistica ampia di campioni di sangue midollare e periferico. Tutti i pazienti inclusi nello studio verranno caratterizzati dal punto di vista molecolare e citogenetico per la presenza delle comuni alterazioni molecolari. Tutti i dati clinici saranno raccolti e analizzati.

La quantificazione della proteina avverrà mediante western blot utilizzando anticorpi monoclonali anti EphA3 (prodotto in collaborazione con M. Lackmann, (Monash University, Clayton, Victoria Australia) e anti ROS1 (Abcam). La localizzazione della proteina verrà indagata mediante marcatura con anticorpi specifici utilizzando la microscopia confocale. Infine per quanto riguarda la valutazione dell'espressione di EphA3 in particolari compartimenti cellulari quali le cellule CD34+, CD34+ CD38- o le plasmacellule CD138+ verrà utilizzata la citometria a flusso (FACS) e un anticorpo specifico prodotto in collaborazione con M. Lackmann.

Valutare l'espressione di EphA3 e ROS1 in diversi tumori solidi inclusi il tumore del polmone, mammario, colon retto, pancreas e prostata.

La valutazione dell'espressione del trascritto di EphA3 e ROS1 verrà eseguita mediante Real Time PCR come descritto sopra utilizzando RNA estratto da neoplasie primarie.

La valutazione della proteina avverrà principalmente su preparato istologico mediante reazioni di immunistochimica con anticorpi specifici.

Lo studio prevede l'analisi di almeno 100 campioni di neoplasie appartenenti ai diversi istotipi.

I dati biologici e clinici dei pazienti analizzati verranno raccolti e analizzati in parallelo ai dati di espressione ottenuti nello studio

Valutare la presenza di eventuali mutazioni di EphA3 e ROS1 tanto nelle malattie linfoproliferative che nei tumori solidi.

Poiché ad oggi esistono sporadici reports circa la presenza di mutazioni di EphA3 nei tumori solidi e nessun dato nelle malattie onco-ematologiche, lo studio prevede di eseguire un'analisi di sequenza dell'intera coding sequence del gene EphA3 alla ricerca di mutazioni attivanti nei campioni di sangue midollare o periferico provenienti da pazienti affetti da linfoproliferative e da tumori solidi.

Il DNA dei pazienti verrà pertanto estratto con procedure standard e l'analisi di sequenza condotta utilizzando la tecnica del gene sequencing. Inoltre, mentre in alcuni tumori solidi è descritta la presenza di traslocazioni cromosomiche coinvolgenti il

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

gene ROS1, nella maggior parte dei tumori solidi e delle malattie mieloproliferative la presenza di mutazioni nella coding sequence non è stata indagata. L'intera coding sequence del gene ROS1 verrà pertanto indagata come descritto per EphA3.

Valutazione dell'espressione di ROS1 e di EphA3 nel microambiente midollare

Poiché il segnale delle EphA3 è bidirezionale e, tanto i ligandi che il recettore sono prodotti e presenti sia dalla cellula emopoietica che stromale, appare di grande rilevanza analizzare la presenza di EphA3 e dei suoi ligandi preferenziali sulle cellule stromali ottenute da pazienti affetti da malattie oncoematologiche.

Le cellule stromali verranno ottenute coltivando in vitro in terreni specifici per 5 settimane le cellule di sangue midollare ottenute al momento della diagnosi.

Dopo 5 settimane le cellule verranno rimosse dalla capsula di coltura mediante tripsina, analizzate per l'assenza di cellule CD45+ mediante citofluorimetria e sottoposte in parte a estrazione di RNA per l'analisi di espressione dei trascritti (EphA3, 3 efrine) e in parte posizionate su un vetrino per la marcatura con anticorpo specifico anti EphA3 per l'analisi della proteina. La stessa procedura verrà applicata per la valutazione del trascritto e della proteina ROS1.

Valutare l'eventuale influenza di un microambiente ipossico sull'espressione di EphA3 e ROS1

Poiché alcuni dati della letteratura suggeriscono che il microambiente midollare, fortemente ipossico, sia in grado di proteggere le cellule staminali dall'azione di chemioterapici e di farmaci molecolari mediante l'espressione di alcune molecole che appaiono regolate dall'ipossia stessa, in particolare dal pathway di HIF1 α , appare rilevante in vista di una terapia molecolare che mira a eliminare la cellula staminale leucemica, valutare il possibile ruolo dell'ipossia nell'indurre o nell'inibire l'espressione di EphA3 e ROS1.

I campioni di BM e PB verranno prelevati e in parte posizionati sotto una cappa ipossica a diverse tensioni di ossigeno per tempi differenti. Parte del campione, utilizzato come controllo, verrà trattato in condizioni standard. Al termine della coltura verrà estratto l'RNA sia dal campione ipossico che dal campione di controllo e la quantità di trascritto ROS1 e EphA3 valutata mediante Real Time PCR come descritto.

Valutazione dell'effetto di una efficace inibizione di EphA3 e di ROS1 su campioni di sangue periferico e midollare ottenuto da pazienti affetti da malattie linfoproliferative acute e croniche.

I campioni di sangue midollare e periferico verranno incubati con Ab monoclonale KB004 (Kalobios) utilizzando le condizioni e la metodica precedentemente utilizzate. 12

Al termine dell'incubazione l'apoptosi verrà valutata attraverso la conta delle cellule esprimenti annexin V mediante analisi FACS. Con tale metodica sarà possibile valutare anche il numero di cellule CD34+ positive apoptotiche mediante doppia marcatura (CD34 e Annexin V).

La proliferazione sarà valutata mediante saggio di incorporazione della timidina triaziata e mediante metodica MTT.

Infine, quando appropriato, l'inibizione dell'attività clonogenica verrà valutata attraverso la conta della crescita di colonie emopoietiche in metilcellulosa delle cellule incubate con anticorpo e delle cellule di controllo. L'azione sui progenitori staminali verrà infine valutata mediante colture cellulari per la valutazione delle LTC-IC. L'adesione cellulare prima e dopo incubazione con anticorpo verrà valutata mediante saggi colorimetrici.

In modo analogo si valuterà l'effetto dell'inibizione di ROS1 in seguito a incubazione con inibitori specifici. La proliferazione, l'apoptosi, l'adesione cellulare, la crescita di colonie emopoietiche verranno valutate dopo 24, 36 e 72 ore di incubazione delle cellule ottenute da BM e PB, previa valutazione dell'espressione della proteina ROS1, come descritto sopra.

14 : Analisi Citofluorimetrica di Cellule T-Regolatorie nelle Patologie Onco-Ematologiche

Responsabile: D'Auria Fiorella

Programma:

Parole chiave:

Altri enti coinvolti: IRCCS CASA SOLLIEVO DELLA SOFFERENZA Dott. D'Arena,
UNIVERSITA' TOR VERGATA - ROMA , Prof. Del Poeta,

Anno inizio: 2010

Durata: 24

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Altro

Descrizione: In condizioni fisiologiche, una delle principali caratteristiche del Sistema Immunitario è la sua capacità di reagire a un'enorme varietà di antigeni microbici senza reagire agli antigeni propri (self) di un individuo. Questa mancanza di responsività verso gli antigeni self viene definita tolleranza immunologica. La tolleranza immunologica a un antigene self può essere indotta quando, durante la sua maturazione, il linfocita incontra tale antigene negli organi linfoidi primari (in questo caso si parla di tolleranza centrale) oppure quando il linfocita, ormai maturo, incontra l'antigene self nei tessuti periferici (in questo caso si parla invece di tolleranza periferica).

Alla fine degli anni '90 è stata scoperta una sottopopolazione specializzata di linfociti T, chiamate cellule T regolatorie (Treg), capace di sopprimere l'attivazione del sistema immunitario regolandone l'omeostasi e la tolleranza verso antigeni self. Le Treg, sopprimendo le risposte effettrici di altre cellule, sono un importante self-check insito nel sistema immunitario, capace di prevenire reazioni eccessive una volta che l'antigene è stato eliminato limitando così il danno tissutale.

Le Treg derivano da diversi tipi cellulari, alcune esprimono la glicoproteina di membrana CD8, altre la glicoproteina CD4, la catena alfa del recettore dell'interleuchina-2 (CD25) e Foxp3 (fattore di trascrizione fondamentale per la differenziazione aTreg), altre si differenziano da tipi a funzione suppressor come TR1, Th3, CD8+CD28-, e quelle ristrette per Qa-1 (HLA-E per la specie umana). Tali cellule si riconoscono per le principali citochine prodotte TGF-beta, IL-10, per la scarsa attitudine proliferativa, per una bassa produzione di citochine linfotrope (in particolare IL-2 e INF-γ) e per la capacità di sopprimere la produzione di queste citochine anche in cellule effettrici attivate come CD8+ (CTL), CD4+ (a funzione Th1 o Th2), NK, cellule dendritiche e macrofagi.

La sola produzione di citochine immunosoppressive IL-10 e TGF-beta da parte delle cellule Treg non sembra però essere sufficiente a produrre un effetto soppressivo ottimale, cosa che si osserva, invece, quando le cellule effettrici e quelle regolatorie sono in diretto contatto, suggerendo il coinvolgimento di molecole di superficie.

Il timo ha un ruolo importante nella generazione delle Treg come dimostra l'autoimmunità prodotta dalla timoectomia neonatale a tre giorni nei ratti.

Come l'attività delle Treg moduli la risposta immunitaria non è ancora ben conosciuto, infatti se da una parte previene lo sviluppo di malattie autoimmuni, dall'altra non è auspicabile durante la risposta a microrganismi patogeni o in corso di neoplasie. Le ipotesi attuali suggeriscono che l'incontro con microrganismi infettivi produrrebbe una inibizione diretta delle Treg o indiretta attraverso altre cellule del sistema immunitario per facilitare l'eliminazione dell'infezione. Nonostante tutto, prove sperimentali dimostrano che alcuni agenti patogeni si siano evoluti per manipolare le Treg, immunosopprimendo l'ospite per potenziare la propria sopravvivenza. Infatti l'attività Treg aumenta considerevolmente in infezioni da retrovirus come per HIV, da micobatteri, in varie parassitosi comprese Leishmania e Plasmodium. Inoltre TGF-beta e IL-10 sono le maggiori citochine presenti nell'ambiente extracellulare tumorale e anche le Treg circolanti sono risultate aumentate in pazienti con cancro.

In origine, per identificare e monitorare le Treg si usavano Ab monoclonali per rivelare con tecniche di citometria o immunocitochimica, un'alta espressione di CD4 e CD25, ma nel corso di una risposta immunitaria ad un agente patogeno anche i linfociti T CD4+ maturi a funzione helper lo sovraesprimono. Poi si è pensato di monitorare FOXP3 fattore di trascrizione della famiglia genica Forkhead (Forkhead box P3) necessario per lo sviluppo delle cellule Treg in quanto controlla un programma genetico che specifica questa differenziazione.

Alcuni gruppi di ricerca hanno inoltre pensato di usare come marker delle Treg l'assenza o il basso livello di espressione della proteina di superficie CD127 (catena alfa del recettore dell'interleuchina-7) in combinazione con la presenza di CD4 e CD25.

Referenze:

1. Dercamp C, Chemin K, Caux C, Trinchieri G, Vicari AP. Distinct and overlapping roles of interleukin-10 and CD25+ regulatory T cells in the inhibition of antitumor CD8 T-cell responses. *Cancer Res* 2005; 65:8478-8486.
2. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, et al. CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer functions in a transforming growth factor beta-dependent manner. *J Exp Med* 2005; 202:1075-1085.
3. Zhu X, Ma LL, Ye T. Expression of CD4+CD25highCD127low/- regulatory T cells in transitional cell carcinoma patients and its significance. *J Clin Lab Analysis* 2009; 23:197-201.
4. Shen LS, Wang J, Shen DF, et al. CD4(+) CD25(+) CD127(low/-) regulatory T cells express Foxp3 and suppress effector T cell proliferation and contribute to gastric cancers progression. *Clin Immunol* 2009; 131(1):109-118.
5. Kono K, Kawaida H, Takahashi A, et al. CD4(+) CD25(high) regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers.
6. Li X, Ye DF, Xie X, Chen HZ, Lu WG. Proportion of CD4+CD25+ regulatory T cell is increased in the patients with ovarian carcinoma. *Cancer Invest* 2005; 23:399-403.
7. Miller AM, Lundeberg K, Ozenci V. CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

patients. J Immunol 2006; 177:7398-7405.

Risultati e prodotti conseguiti:

Attività previste Analizzare la quantità di cellule T regolatorie CD4+CD25highCD127low/- e i livelli delle citochine Il-7, Il-10 e TGF-beta nel sangue periferico di controlli sani e di pazienti con patologie ematologiche (anemie) e oncoematologiche (mieloma multiplo, leucemie, linfomi, sindromi mielodisplastiche) alla diagnosi e in seguito a chemioterapia per individuare una relazione con le differenti caratteristiche clinico-patologiche.

Pazienti:

- pazienti con diagnosi di: mieloma multiplo, sindrome mielodisplastica, linfoma di Hodgkin, linfoma non-Hodgkin, leucemia acuta, leucemia linfatica cronica, sindrome mieloproliferativa cronica, anemia;
- controlli sani.

Procedure:

raccolta dati clinici dei pazienti al momento dell'analisi citofluorimetrica:

- Anamnesi
- diagnosi clinica secondo i criteri WHO
- emocromo
- schema di chemioterapia effettuato (alle valutazioni successive alla diagnosi)

Analisi citofluorimetrica

- Campione: sangue periferico (in EDTA) processato entro 24 ore.
- Metodo lyse-no wash
- Per una corretta analisi acquisire se possibile 100.000 eventi.
- Parametri citofluorimetrici: isolamento dei linfociti mediante parametri fisici (FSC/SSC), valutazione della % di linfociti positivi per l'antigene CD4, per l'antigene CD25 espresso ad alta intensità e negativi per l'antigene CD127.

Test ELISA

- Campione: siero fresco o congelato.
- Parametri valutati con metodica ELISA: Il-7, TGF-beta, Il-10.

15 : Valutazione delle Cellule t-regolatorie nelle patologie onco-ematologiche

Responsabile: D'Auria Fiorella

Programma:

Parole chiave:

Altri enti coinvolti: Unità di Ematologia e Trapianto Cellule Staminali, IRCCS Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza", S. Giovanni Rotondo (FG), Dott. D'Arena

Anno inizio: 2010

Durata: 24

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Altro

Descrizione: In condizioni fisiologiche, una delle principali caratteristiche del Sistema Immunitario è la sua capacità di reagire a un'enorme varietà di antigeni microbici senza reagire agli antigeni propri (self) di un individuo. Questa mancanza di responsività verso gli antigeni self viene definita tolleranza immunologica. La tolleranza immunologica a un antigene self può essere indotta quando, durante la sua maturazione, il linfocita incontra tale antigene negli organi linfoidi primari (in questo caso si parla di tolleranza centrale) oppure quando il linfocita, ormai maturo, incontra l'antigene self nei tessuti periferici (in questo caso si parla invece di tolleranza periferica).

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Alla fine degli anni '90 è stata scoperta una sottopopolazione specializzata di linfociti T, chiamata cellule T regolatorie (Treg), capace di sopprimere l'attivazione del sistema immunitario regolandone l'omeostasi e la tolleranza verso antigeni self. Le Treg, sopprimendo le risposte effettrici di altre cellule, sono un importante self-check insito nel sistema immunitario, capace di prevenire reazioni eccessive una volta che l'antigene è stato eliminato limitando così il danno tissutale.

Le Treg derivano da diversi tipi cellulari, alcune esprimono la glicoproteina di membrana CD8, altre la glicoproteina CD4, la catena alfa del recettore dell'interleuchina-2 (CD25) e Foxp3 (fattore di trascrizione fondamentale per la differenziazione a Treg), altre si differenziano da tipi a funzione suppressor come TR1, Th3, CD8+CD28-, e quelle ristrette per Qa-1 (HLA-E per la specie umana). Tali cellule si riconoscono per le principali citochine prodotte TGF-beta, IL-10, per la scarsa attitudine proliferativa, per una bassa produzione di citochine linfotrope (in particolare IL-2 e INF- γ); e per la capacità di sopprimere la produzione di queste citochine anche in cellule effettrici attivate come CD8+ (CTL), CD4+ (a funzione Th1 o Th2), NK, cellule dendritiche e macrofagi.

La sola produzione di citochine immunosoppressive IL-10 e TGF-beta da parte delle cellule Treg non sembra però essere sufficiente a produrre un effetto soppressivo ottimale, cosa che si osserva, invece, quando le cellule effettrici e quelle regolatorie sono in diretto contatto, suggerendo il coinvolgimento di molecole di superficie.

Il timo ha un ruolo importante nella generazione delle Treg come dimostra l'autoimmunità prodotta dalla timoectomia neonatale a tre giorni nei ratti.

Come l'attività delle Treg moduli la risposta immunitaria non è ancora ben conosciuto, infatti se da una parte previene lo sviluppo di malattie autoimmuni, dall'altra non è auspicabile durante la risposta a microrganismi patogeni o in corso di neoplasie. Le ipotesi attuali suggeriscono che l'incontro con microrganismi infettivi produrrebbe una inibizione diretta delle Treg o indiretta attraverso altre cellule del sistema immunitario per facilitare l'eliminazione dell'infezione. Nonostante tutto, prove sperimentali dimostrano che alcuni agenti patogeni si siano evoluti per manipolare le Treg, immunosopprimendo l'ospite per potenziare la propria sopravvivenza. Infatti l'attività Treg aumenta considerevolmente in infezioni da retrovirus come per HIV, da micobatteri, in varie parassitosi comprese Leishmania e Plasmodium. Inoltre TGF-beta e IL-10 sono le maggiori citochine presenti nell'ambiente extracellulare tumorale e anche le Treg circolanti sono risultate aumentate in pazienti con cancro.

In origine, per identificare e monitorare le Treg si usavano Ab monoclonali per rivelare con tecniche di citometria o immunocitochimica, un'alta espressione di CD4 e CD25, ma nel corso di una risposta immunitaria ad un agente patogeno anche i linfociti T CD4+ maturi a funzione helper lo sovraesprimono. Poi si è pensato di monitorare FOXP3 fattore di trascrizione della famiglia genica Forkhead (Forkhead box P3) necessario per lo sviluppo delle cellule Treg in quanto controlla un programma genetico che specifica questa differenziazione.

Alcuni gruppi di ricerca hanno inoltre pensato di usare come marker delle Treg l'assenza o il basso livello di espressione della proteina di superficie CD127 (catena alfa del recettore dell'interleuchina-7) in combinazione con la presenza di CD4 e CD25.

Risultati e prodotti conseguiti:

Attività previste Attività previste. Analizzare la quantità di cellule T regolatorie CD4+CD25^{high}CD127^{low/-} e i livelli delle citochine IL-7, IL-10 e TGF-beta nel sangue periferico di controlli sani e di pazienti con patologie ematologiche (anemie) e oncoematologiche (mieloma multiplo, leucemie, linfomi, sindromi mielodisplastiche) alla diagnosi e in seguito a chemioterapia per individuare una relazione con le differenti caratteristiche clinico-patologiche.

Pazienti:

- pazienti con diagnosi di: mieloma multiplo, sindrome mielodisplastica, linfoma di Hodgkin, linfoma non-Hodgkin, leucemia acuta, leucemia linfatica cronica, sindrome mieloproliferativa cronica, anemia;
- controlli sani.

Procedure:

raccolta dati clinici dei pazienti al momento dell'analisi citofluorimetrica:

- Anamnesi
- diagnosi clinica secondo i criteri WHO
- emocromo
- schema di chemioterapia effettuato (alle valutazioni successive alla diagnosi)

Analisi citofluorimetrica

- Campione: sangue periferico (in EDTA) processato entro 24 ore.
- Metodo lyse-no wash
- Per una corretta analisi acquisire se possibile 100.000 eventi.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

- Parametri citofluorimetrici: isolamento dei linfociti mediante parametri fisici (FSC/SSC), valutazione della % di linfociti positivi per l'antigene CD4, per l'antigene CD25 espresso ad alta intensità e negativi per l'antigene CD127.

Test ELISA

- Campione: siero fresco o congelato.

- Parametri valutati con metodica ELISA: Il-7, TGF-beta, Il-10.

16 : Espressione dei microRNA nelle plasmacellule di pazienti affetti da Mieloma Multiplo: implicazioni diagnostiche e prognostiche

Responsabile: De Luca Luciana

Programma:

Parole chiave:

Altri enti coinvolti: The Ohio State University, Divisione di Ematologia dell'Università di Torino

Anno inizio: 2010

Durata: 24

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Altro

Descrizione: Il Mieloma Multiplo è la seconda più frequente neoplasia del sangue e la sua frequenza è in aumento nelle nazioni sviluppate. Le alterazioni biologiche e i comportamenti clinici di questa neoplasia sono molto eterogenei anche se continua ad essere una malattia mortale. Sebbene diverse mutazioni genetiche sono state descritte, le cause della malattia rimangono ancora inspiegate. La recente introduzione di nuovi farmaci nella terapia incrementa la velocità di risposte e lesito clinico, anche se ci sono casi di pazienti che hanno avuto una rapida ricaduta o che sono risultati refrattari alla terapia. Un precoce e solido marker prognostico per identificare i pazienti ad alto rischio e ancora inesistente è l'approccio terapeutico e lo stesso per tutti i pazienti.

Lo scopo di questo progetto è quello di studiare i microRNA, piccole parti del genoma, per identificare peculiari caratteristiche di malattie aggressive e per incrementare la conoscenza dei meccanismi che causano il cancro. Un altro obiettivo potrebbe essere l'individuazione di lesioni molecolari che potrebbero essere usate come target terapeutici. Le analisi verranno effettuate su cellule cancerogene raccolte durante la diagnosi da un largo numero di pazienti trattati uniformemente. Questo tipo di analisi valuterà la possibilità di ottenere tessuti, per eseguire l'analisi di fattori prognostici, in maniera meno dolorosa.

I risultati di questo progetto aiuteranno a capire perché i pazienti sono affetti da Mieloma Multiplo, perché alcune cellule cancerogene sono resistenti ai farmaci in uso, e permetterà una identificazione precoce dei pazienti ad alto rischio. Questo sarà il primo step per identificare una base prognostica che possa guidare le decisioni terapeutiche e identificare nuove alterazioni utilizzabili come target per i futuri farmaci.

Risultati e prodotti conseguiti:

Attività previste- Identificare i microRNA con forte valore prognostico: Noi intendiamo effettuare un'analisi di espressione sui microRNA dell'intero genoma utilizzando 350 campioni di plasma cellule derivanti da pazienti con Mieloma Multiplo (MM) arruolati in un trial clinico in fase III in modo da confrontare il trattamento tra il Velcade-Melphalan-Prednisone (VMP) e il Velcade-Melphalan-Prednisone-Thalidomide (VMPT).

- Validare l'assoluta determinazione di miRNA: Noi programmiamo di usare il nanoString, una nuova tecnologia per il profiling dei microRNA, per una determinazione assoluta dell'espressione di questi ultimi nel MM.

- Identificazione di nuove alterazioni molecolari nel cancro: A differenza delle alterazioni molecolari fino ad ora riscontrate nelle plasmacellule maligne, il MM è una malattia molto eterogenea, e dei nuovi approcci sono richiesti per comprendere la patogenesi e chiarirne la classificazione. A tale scopo noi ci proponiamo di investigare sull'espressione di miRNA presenti nelle plasmacellule di soggetti sani, di pazienti con gammopatia monoclonale e di pazienti con MM. Questo approccio ci aiuterà a caratterizzare le alterazioni molecolari di queste neoplasie del sangue e ad associare una particolare caratteristica

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

con un peculiare fenotipo clinico, costruendo la via verso una terapia basata su particolari alterazioni di ogni paziente col cancro.

17 : STUDIO SULLA IDENTIFICAZIONE DELLE CANCER STEM CELL NEI TUMORI DELLA REGIONE HEAD-NECK E SUL LORO POSSIBILE RUOLO NELLA PROGRESSIONE TUMORALE

Responsabile: Mazzotta Manuela

Programma:

Parole chiave: Cancer stem cell, oral cancer

Altri enti coinvolti: Università degli Studi di Foggia

Anno inizio: 2010

Durata: 24

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Altro

Descrizione: La recente teoria delle cellule staminali tumorali suggerisce che la genesi e il mantenimento del tumore sarebbero garantiti da una piccola sottopopolazione biologicamente simile alle cellule staminali, le cosiddette cancer stem cell (CSC), popolazione di cellule indifferenziate, pluripotenti, auto-rinnovantesi e capaci di espandersi in popolazioni altamente differenziate. Poiché hanno tipicamente un ciclo proliferativo estremamente lento, le CSC riescono a resistere alla maggioranza delle terapie antitumorali tradizionali che invece colpiscono la frazione cellulare rapidamente proliferante e sarebbero pertanto responsabili della chemioresistenza tumorale. Sino ad oggi, l'esistenza delle CSC è stata dimostrata nelle leucemie, nel cancro della mammella, nel glioblastoma e più di recente nei tumori della prostata, del polmone e del colon mediante specifici marcatori cellulari di superficie. Nonostante però l'accumularsi di evidenze scientifiche a supporto dell'esistenza delle CSC nei tumori umani, i marcatori per individuare le CSC nei tumori della regione testa-collo restano sconosciuti. Dato l'impatto epidemiologico e la prognosi estremamente severa di queste neoplasie, l'identificazione delle CSC e la caratterizzazione dei meccanismi di auto-rinnovamento è cruciale per identificare specifici bersagli molecolari per nuove e più efficaci terapie per i tumori della regione testa collo che sono notoriamente chemioresistenti. Nello specifico il programma di ricerca si propone di analizzare tessuti tumorali e linee cellulari di neoplasie della regione testa-collo utilizzando marcatori come CD44, CD133, in modo da caratterizzare fenotipicamente le CSC per poterle differenziare rispetto alle non staminali mediante la valutazione del tasso di replica, capacità invasiva ed attività apoptotica. Si cercherà poi di valutare in vivo il potenziale tumorigenico delle CSC e validare un modello di carcinogenesi in vitro ed in vivo, per cui CSC sortate (prima e dopo silenziamento genico) saranno utilizzate in vitro ed in vivo per studiarne il potenziale tumorigenico in topi immunodeficienti

Risultati e prodotti conseguiti: Nelle prime fasi, si è iniziato lo studio con la preparazione delle linee cellulari. Dalla linea cellulare PE/CA-PJ15 è stato isolato un sub-clone, chiamato PE/CA-PJ15D, che si è aggiunto alle linee già a disposizione: KB, linea di carcinoma spino cellulare commerciale usata in questo studio come linea di riferimento, HN ed il suo sub-clone HNT e per gentile concessione del Dr. Kudo (Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, Japan) le linee MSCC1 ed MSCC1-inv ed Ho-1-N-1 e Ho-1-U-1. Tutte le linee cellulari sono state amplificate e stabilizzate in terreni di coltura completi (D-MEM, RPMI 1640; Euroclone, UK) che non richiedono fattori di crescita specifici, ad eccezione delle linee MSCC1, MSCC1-inv e NHEK che richiedono un terreno specifico per cheratinociti (KGM; Lonza group, Ltd) arricchito da fattori di crescita appropriati. Per documentare la differente velocità di replicazione delle linee cellulari e dei sub-cloni, le cellule (5x 10³) sono state seminate in piastre da 24 pozzetti che sono state incubate a 37°C in presenza di CO₂ al 5%. Si sta procedendo ora all'isolamento dei cloni CD133+ mediante le tecniche di citometria di flusso con sorter ed biglie magnetiche della Myltheni. La prima linea esaminata è stata la KB. Cellule sia di osteosarcoma MG63 che di carcinoma squamocellulare del cavo orale KB sono state coltivate fino ad ottenere 4 slides e 10 fiasche in totale. Le cellule sono state espanse in apposito mezzo di coltura. Poi sia le cellule nelle slides, che quelle nelle fiasche, sono state marcate aggiungendo nel mezzo di coltura uno specifico anticorpo diretto contro la proteina CD133. Un Citometro FACScan (Becton & Dickinson, San Jose, California, USA) con laser ad argon e lo specifico programma FACScan research software sono stati utilizzati per analizzare le linee cellulari. Il marker CD133 è stato validato con colorazione immunocitochimica sulle slides. Le analisi di citometria di flusso, eseguite su entrambe le linee cellulari, hanno mostrato che queste cellule esprimevano una positività per l'antigene CD133 delle cancer stem cell anche se in misura differente. Infatti tale positività

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

risultava molto più evidente nelle cellule MG63 che nelle KB. Le KB presentavano una positività al marker CD133 inferiore al 5%. Questo risultato è in linea con altri studi effettuati sui tumori epiteliali, come il carcinoma laringeo, mentre le MG63 presentavano una positività al marker CD133 del 41,5%. La colorazione immunocitochimica, eseguita come tecnica di controllo, ha confermato i dati della citofluorimetria mostrando una diversa positività della proteina CD133 tra le culture di osteosarcoma e quelle di carcinoma squamocellulare. Infatti nelle cellule MG63 la colorazione per CD133 era sempre prevalente, mentre nelle cellule KB era riscontrabile una debole espressione di CD133. Per quanto riguarda il carcinoma orale la presenza di cellule CD133+ anche nella linea KB dimostra il possibile ruolo ricoperto dalle cellule staminali tumorali nella cancerogenesi orale aprendo la strada a nuovi studi nella terapia del carcinoma orale basato sulla individuazione e l'eliminazione delle cancer stem cell. Si sa ora procedendo allestame delle altre linee cellulari

Attività previste Nelle fasi successive si prevede di completare lo studio dell'espressione di CD133 nelle linee rimanenti. Individuate le linee più promettenti si ricorrerà all'arricchimento delle stesse con cellule CD133+ utilizzando le tecniche di citometria di flusso con fac sorter e biglie magnetiche. Si cercherà poi di valutare in vivo il potenziale tumorigenico delle CSC e validare un modello di carcinogenesi in vitro ed in vivo, per cui CSC sortate (prima e dopo silenziamento genico) saranno utilizzate in vitro ed in vivo per studiarne il potenziale tumorigenico in topi immunodeficienti

18 : Distinzione di una perdita aerea attiva da un effetto camera mediante un sistema di raccolta digitalizzato per drenaggio toracico

Responsabile: LEQUAGLIE COSIMO

Programma:

Parole chiave: Perdita aerea, drenaggio toracico digitale, pneumotorace

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2010

Durata: 24

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Altro

Descrizione: Studio realizzato con la finalità di distinguere una perdita aerea parenchimale da un effetto camera, caratterizzati da reperti clinici del tutto sovrapponibili al vaglio di un drenaggio toracico tradizionale, ma gravati da differente impatto prognostico; la perdita aerea è infatti potenzialmente gravata da severe complicanze settiche, dal rischio di re-intervento e dalla prolungata permanenza del tubo di drenaggio toracico, mentre un effetto camera è un fenomeno frequente ed assolutamente compatibile con la precoce rimozione del drenaggio. L'impiego di un sistema digitalizzato come il DigiVent della Millicore, mediante la misurazione istantanea e cumulativa e la registrazione dei flussi aerei trans-pleurici e delle pressioni endopleuriche, comporta la possibilità di operare una distinzione tra i due fenomeni, identificando un effetto camera e consentendo la tempestiva rimozione del tubo di drenaggio, con sensibile riduzione dei tempi di degenza post-operatoria e delle complicanze correlate alla prolungata permanenza di un drenaggio pleurico (infezioni, dolore e conseguente riduzione della compliance del paziente).

Risultati e prodotti conseguiti:

Attività previste Identificazione dell'effetto camera e sua distinzione dalle perdite aeree polmonari parenchimali, con impatto sui tempi di degenza post-operatoria

19 : Efficacia del Tachosil nel trattamento delle perdite aeree in Chirurgia Toracica

Responsabile: LEQUAGLIE COSIMO

Programma:

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Parole chiave: Perdita aerea, drenaggio toracico, aerostasi

Altri enti coinvolti: Ospedale Vito Fazzi Lecce
I.F.O. - Roma
A.O.U. OO.RR. Foggia
Policlinico Gemelli Roma
Fondazione Pascale Napoli
A.O. Monaldi Napoli
Ospedale San Carlo Potenza
A.O. Mater Domini Catanzaro
Ospedale Civile Forlì
Policlinico Bari
Ospedale S. Spirito Pescara
Ospedale Vittorio Emanuele Catania
Ospedale San Paolo Bari
Ospedale Card. G. Panico Tricase
Ospedale Civile Chieti

Anno inizio: 2010

Durata: 24

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Descrittiva

Descrizione: Studio realizzato presso 17 centri universitari e/o ospedalieri italiani, la cui finalità consisterà nel valutare l'efficacia dell'applicazione del Tachosil® (patches di collagene ricoperti di fibrinogeno e trombina) sulle perdite aeree parenchimali e di determinare se il suo impiego comporti una riduzione della frequenza/severità delle perdite aeree intraoperatorie, della durata di permanenza dei drenaggi toracici, della durata delle perdite aeree post-operatorie e dei tempi di degenza. Lo studio è quindi indirizzato ad un miglioramento della pratica clinica nel tentativo di ridurre la degenza dei pazienti con perdita aerea dopo resezioni polmonari anatomiche od atipiche e ridurre il dolore post-operatorio imputabile alla necessità di mantenere in sede i drenaggi pleurici durante la persistenza della perdita aerea.

Risultati e prodotti conseguiti:

Attività previste: Riduzione della incidenza e della durata delle perdite aeree polmonari parenchimali, con impatto sui tempi di degenza post-operatoria.

2 : Inibizione farmacologica delle interazioni tra microambiente midollare, angiogenesi e plasmacellule tumorali nel mieloma multiplo.

Responsabile: Musto Pellegrino

Programma:

Parole chiave: Mieloma, Angiogenesi, Microambiente Midollare, Bortezomib, Dasatinib, Acido Zoledronico

Altri enti coinvolti: Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Bari

Anno inizio: 2008

Durata: 24

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Altro

Descrizione: L'angiogenesi e la vasculogenesi rappresentano una sequenza di eventi che conducono alla formazione di nuovi vasi sanguigni. La vasculogenesi è fondamentale per lo sviluppo di una rete vascolare primaria durante la vita embrionale, e

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

consiste nella formazione di nuovi vasi a partire dagli angioblasti del mesoderma. Nei pazienti con mieloma multiplo (MM), il midollo osseo è caratterizzato da una variegata popolazione cellulare (microambiente) nella quale, oltre alle plasmacellule, si riconoscono le cellule staminali (CS) i macrofagi e le cellule endoteliali (CE). Nei soggetti normali, è stato dimostrato che sia le CS che cellule di derivazione mesenchimale, quali i monociti ed i macrofagi, contribuiscono alla vasculogenesi post-natale. La letteratura indica che la formazione dei vasi e la sopravvivenza delle reti vascolari neoformate, che rappresentano fasi distinte del processo angiogenico, sono promosse da cellule di origine mesenchimale attraverso meccanismi paracrini. In particolare, le CS ed i macrofagi sono indotti ad assumere fenotipo simil-endoteliale in risposta a citochine angiogeniche, quali vascular endothelial growth factor (VEGF) e basic fibroblast growth factor (bFGF), che sono tipicamente secrete dalle plasmacellule tumorali. I risultati di diversi studi hanno confermato che, analogamente ai tumori solidi, anche nei tumori plasmacellulari l'angiogenesi correla direttamente con lo stadio di malattia: l'angiogenesi è scarsa o assente nei pazienti con MGUS o con MM non attivo (MM in remissione completa o parziale; fase di plateau), mentre è molto intensa nel MM attivo (diagnosi, recidiva) ed ancor più accentuata nelle fasi evolute (leucosi plasmacellulare). Altri autori hanno dimostrato che le cellule mesenchimali dello stroma midollare stimolano la crescita dei vasi nel MM. Sulla base di questi dati, è stato possibile ipotizzare che nei pazienti con MM, le CS ed i macrofagi midollari, in seguito a stimolazione con fattori angiogenici presenti nell'ambiente stromale, quali VEGF e bFGF, possano assumere un fenotipo simil-endoteliale e che le CS ed i macrofagi così stimolati siano in grado di formare vasi in vitro. La vasculogenesi è un processo fisiologico tipico dello sviluppo fetale. Nuovi vasi sanguigni si generano a partire da precursori indifferenziati (o angioblasti), diversamente da quanto avviene nell'angiogenesi, nella quale i neovasi si formano per gemmazione da vasi preesistenti. Vari studi hanno dimostrato angioblasti sia in circolo che nei tessuti anche nella vita postatale, capaci di differenziarsi in senso endoteliale o in altri istotipi, a seconda della natura dello stimolo. Pertanto, è stata dimostrata vasculogenesi anche nella vita postatale sia nei tessuti ischemici che neoplastici. Alcune evidenze indicano che una piccola percentuale delle CE midollari dei pazienti con MM esprimono sulla loro superficie l'antigene CD133, specifico delle CS indifferenziate e che le CS ematopoietiche dei pazienti con MM sono in grado di differenziarsi in senso endoteliale, quando poste in coltura in presenza delle citochine plasmacellulari VEGF e bFGF. Esse, infatti, modificano gradualmente il loro fenotipo, perdendo gli antigeni tipici delle cellule indifferenziate (CD133), ed acquisendo un fenotipo endoteliale maturo caratterizzato da intensa espressione del recettore 2 per il VEGF (VEGFR-2/KDR), dell'antigene correlato al fattore-VIII (FVIII-RA) e della caderina VE. Accanto all'acquisizione di antigeni endoteliali, le cellule aderenti alla fibronectina si distendono, mostrando la forma tipica delle CE mature. Le cellule così differenziate, infine, si sono dimostrate in grado di costituire una rete capillare nel sistema del Matrigel così come le CE purificate. È stato inoltre dimostrato il ruolo attivo delle cellule stromali nel mantenimento e nella progressione delle linfoproliferazioni B-cellulari, quale il MM. La popolazione stromale del midollo osseo del MM costituita da macrofagi, fibroblasti, cellule muscolari lisce, CE, osteoclasti e cellule del sistema immunitario, contribuisce infatti a produrre la fase vascolare tramite la secrezione di numerosi fattori angiogenici che agiscono in sinergismo con quelli secreti dalle plasmacellule tumorali. Il macrofago midollare media dunque la neovascolarizzazione del MM attraverso vasculogenesi simil-embriionale, contribuendo in tal modo alla progressione della malattia. I macrofagi dei pazienti con MM formano essi stessi neovasi grazie alla loro capacità di sviluppare un fenotipo simil-endoteliale e di assemblarsi a formare strutture capillari funzionali in risposta alle citochine angiogeniche prodotte dalle plasmacellule mielomatose, quali VEGF e bFGF. Studi recenti indicano che l'acido zoledronico (AZ), un bisfosfonato di terza generazione attivo nel trattamento della malattia metastatica ossea e dell'ipercalcemia, possiede una diretta attività citotossica sulle cellule tumorali e in pazienti con MM in fase attiva inibisce l'angiogenesi delle CE midollari. Inoltre, nella pratica clinica, si osserva un sempre più largo impiego di una nuova classe di farmaci che esercitano inibizione sul proteasoma. Bortezomib è il primo inibitore del proteasoma che ha mostrato attività antitumorale sia in tumori solidi che in neoplasie ematologiche, incluso il MM. Infine Dasatinib è un inibitore delle tirosino-chinasi Srs, PDGF-recettore beta, AKT ed ERK. In letteratura mancano evidenze sperimentali che mostrino se AZ, bortezomib o dasatinib abbiano effetti diretti sulla differenziazione endoteliale delle CS midollari, nonché sull'attività del macrofago midollare che, come detto, sembrano essere al centro dell'attività vasculogenica nello stroma dei pazienti con MM, partecipando attivamente all'angiogenesi e collaborando con le CE alla formazione dei nuovi vasi.

Risultati e prodotti conseguiti: Come descritto nella parte introduttiva, la neo-vascolarizzazione midollare facilita la progressione tumorale in pazienti affetti da MM. Essa è, in particolare, parzialmente sostenuta dai macrofagi midollari attraverso le loro capacità angiogeniche e vasculogeniche. Sono stati prodotti dati che indicano che bortezomib e acido zoledronico, due farmaci ampiamente utilizzati per il trattamento del MM, evidenziano effetti distinti e sinergici di inibizione sui processi di proliferazione cellulare, adesione, migrazione ed espressione di citochine angiogenetiche (VEGF, bFGF, HGF e PDGF) nei macrofagi midollari. Effetti simili sono stati osservati nell'organizzazione della capillarizzazione e nell'espressione di markers vascolari in cellule che acquisiscono capacità vasculogeniche. È stata altresì dimostrata l'inibizione della fosfoattivazione di VEGFR2 e ERK1/2, così come l'attività di NFκB. Questi dati, attualmente sottoposti all'European Journal of Oncology, indicano chiaramente che l'esposizione dei macrofagi midollari di pazienti con MM al trattamento con acido zoledronico e Bortezomib, singolarmente o in combinazione, impatta significativamente la loro capacità angiogenica e vasculogenica, suggerendo che

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

queste cellule potrebbero essere considerate un possibile bersaglio per questi farmaci con pazienti con MM.

AGGIORNAMENTO 2009

E' stato portato a termine, in collaborazione con il Laboratorio di Angiogenesi dell'Universita di Bari, uno studio che ha dimostrato in vitro la attivita sinergica di bortezomib ed acido zoledronico nell'inibire l'angiogenesi e la vasculogenesi dei macrofagi midollari in pazienti affetti da mieloma multiplo.

AGGIORNAMENTO 2010

Il progetto è chiuso.

Si sta valutando la possibilità di analizzare ulteriormente i dati raccolti per la già prevista integrazione con studi di proteomica sulle cellule endoteliali (vedi progetto n. 9 - Analisi proteomica nel mieloma multiplo ed altre neoplasie).

Attività previste E' prevista l'eventuale integrazione dei dati ad oggi prodotti con studi di proteomica sulle cellule endoteliali (vedi progetto n. 9 - Analisi proteomica nel mieloma multiplo ed altre neoplasie).

3 : Trattamento dei tumori cutanei in fase avanzata e non altrimenti trattabili con metodica combinata: elettrochemioterapia + chirurgia,

Responsabile: Fabrizio Tommaso

Programma:

Parole chiave:

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2009

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Terapeutica

Descrizione: Il progetto di ricerca di cui sopra si prefigge l'obiettivo di valutare l'efficacia della elettrochemioterapia, associata al trattamento chirurgico, per le localizzazioni cutanee e sottocutanee di neoformazioni maligne, a diversa istologia, altrimenti giudicate inoperabili, mediante il potenziamento locale, attraverso impulsi elettrici, dell'attività antitumorale di un chemioterapico per nulla o poco permeante la membrana cellulare e che possiede un'alta capacità intrinseca citotossica

Risultati e prodotti conseguiti: Ad oggi, sono stati trattati presso il Nostro Centro 16 pazienti di età compresa tra 56 anni ed 86 anni con una media di età di 75.6, per un totale di 20 applicazioni, utilizzando la Bleomicina alla dose di 15 mg per metro quadro di superficie corporea.

Tipo istologico:

Ca. spinocellulare: 11

Metastasi cutanee da carcinoma mammario: 1

Metastasi cutanea da carcinoma polmonare: 1

Sarcoma: 3

Localizzazione :

Testa e collo: 10

Tronco: 2

arti: 4

Sono stati utilizzati due tipi di elettrodi: due volte il manipolo lineare, quattordici con il manipolo esagonale. Le caratteristiche fisiche degli impulsi sono standard per tutti i tipi di pazienti. Il numero degli impulsi scaricati per ogni paziente varia in base alle dimensioni. La quantità di Bleomicina viene calcolata dal medico oncologo in base alla superficie corporea ed alle patologie correlate.

AGGIORNAMENTO 2009

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Sono stati ad oggi trattati 21 pazienti di età compresa tra 56 anni ed 86 anni con una media di età di 75.6, per un totale di 27 applicazioni utilizzando la Bleomicina alla dose di 15 mg per metro quadro di superficie corporea. Gli istotipi trattati sono quindici carcinomi squamocellulari, due sarcomi di Kaposi, due dermatofibrosarcomi protuberans, una metastasi cutanea da carcinoma polmonare ed un caso di localizzazioni cutanee multiple da carcinoma della mammella, con localizzazioni a testacollo, tronco, arti. Ricordando che il trattamento ha soprattutto intento palliativo, 20 pazienti trattati ne hanno tratto giovamento e sono ritornati a domicilio con notevole miglioramento della qualità di vita; di questi pazienti, 1 è completamente guarito. In un solo caso, pur avendo avuto una notevole riduzione della neoformazione, non è stato possibile eseguire in tempo utile l'intervento definitivo, per motivazioni anestesiolgiche. Ciò ha determinato dopo alcuni mesi la ripresa della malattia, rendendo impossibile ogni altro approccio terapeutico. Si ritiene di dover implementare tale casistica, prima di procedere all'eventuale pubblicazione.

Aggiornamento 2010

Sono stati inclusi nello studio 25 pazienti per un totale di 33 applicazioni. La sede e listotipo delle neoplasie trattate sono così suddivisi.

Localizzazione:

Testa e collo: 15

Tronco: 4

arti: 6

Tipo istologico:

Ca. spinocellulare: 20

Metastasi cutanee da carcinoma mammario: 1

Sarcoma: 3

Metastasi cutanea da melanoma maligno: 1

Attività previste Si tratta di uno Studio clinico non randomizzato della durata di tre anni su pazienti con metastasi cutanee e sottocutanee di ogni tipo istologico tumorale. Le lesioni cutanee verranno trattate con elettrochemioterapia, utilizzando l'applicazione di impulsi elettrici sui tumori per favorire l'ingresso intracellulare della Bleomicina o Cisplatino. Il trattamento consiste in iniezione intravenosa di Bleomicina o Cisplatino seguito da impulsi elettrici generati da un apparecchio denominato Cliniporator tramite manipoli adeguati alla sede ed alle dimensioni della neoplasia. Verificata l'efficacia della risposta dopo 20-30 giorni dall'applicazione, in termini di riduzione delle dimensioni della neoplasia, verrà eseguito l'intervento chirurgico di asportazione della stessa, con intento di radicalità. Le dimensioni della neoplasia verranno rilevate e confrontate con esame clinico, ecografico e radiologico (TAC, RMN). L'obiettivo di questo studio è quello di suddividere i casi con risposta completa, parziale oppure mancata risposta, a distanza di 1, 3, 6, 12 mesi, al fine di dimostrare i benefici ed i costi dell'elettrochemioterapia per i trattamenti cutanei e sottocutanee di differenti istotipi istologici oncologici.

4 : Ruolo delle cellule tumorali circolanti nei pazienti con carcinoma renale in terapia con Sunitinib

Responsabile: Aieta Michele

Programma:

Parole chiave: cellule tumorali circolanti, sunitinib, carcinoma renale, prognosi

Altri enti coinvolti: Sezione di Oncologia, Dipartimento di Oncologia e Scienze Chirurgiche, Università di Padova.

Anno inizio: 2009

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Altro

Descrizione: La determinazione del numero di cellule tumorali circolanti (CTC) ha dimostrato significativa correlazione con la prognosi di

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

pazienti con carcinoma mammario in fase precoce e metastatica, con un cut-off fissato a 5 cellule/7.5 mL di sangue periferico [Cristofanilli Proc Natl Acad Sci U S A 103: 17073-4, 2006]. Dati analoghi si stanno accumulando per il Carcinoma del colon retto e della prostata. Esistono solo sporadici riscontri in letteratura che, anche in pazienti con carcinoma renale, è possibile identificare la presenza di cellule tumorali circolanti.

La determinazione delle CTC è attiva da circa due anni presso Immunologia e Diagnostica Molecolare dello Istituto Oncologico Veneto, mediante utilizzo di piattaforma VERIDEX. Vengono conteggiate le cellule CD45-, EpCAM+ e CITOCHERATINE 8, 18 e/o 19 positive. Sono stati finora valutati prevalentemente campioni di pazienti con carcinoma mammario, e meno frequentemente, altre neoplasie fra cui anche pazienti con carcinoma renale.

Sunitinib (SUTENT®) è un agente orale con azione inibitoria su molteplici proteine con attività tirosin-chinasica implicate nella proliferazione tumorale e nella neo-angiogenesi: c-KIT, PDGFR, VEGFR, FLT-3 e RET, attualmente registrato in Italia per il trattamento del carcinoma renale avanzato. Il trattamento standard consiste in 50 mg totali al giorno per 28 giorni seguiti da pausa di due settimane. Criteri di riduzione di dose si applicano in base alle tossicità riscontrate.

Poiché il farmaco sunitinib interferisce sia con la proliferazione tumorale che con la neoangiogenesi, è ragionevole ipotizzare che durante il trattamento con questo agente si possano verificare delle variazioni della quantità di cellule tumorali circolanti presenti in circolo. Non sono disponibili dati clinici in letteratura al riguardo. Poiché la terapia con sunitinib prevede due settimane di pausa fra un ciclo e l'altro, è possibile pensare che l'effetto sulle cellule tumorali circolanti possa variare a seconda della fase del ciclo in cui vengono determinate.

Si ritiene che l'area di ricerca sia estremamente interessante in funzione della selezione di pazienti apparentemente appartenenti a gruppi prognostici simili, ma che in realtà nel follow-up evolvono, a parità di stadio, grading e istotipo, in maniera completamente differente. Tale aspetto coinvolge le neoplasie più comuni (ca. del colon e del retto, ca. gastrico, ca. vescicale, prostatico, polmonare e mammario).

Risultati e prodotti conseguiti: Il reclutamento dei pazienti affetti da carcinoma renale in trattamento con sunitinib si è concluso da poco. Sono disponibili i campioni di 51 casi e, a breve, inizierà la valutazione dei dati biologici.

AGGIORNAMENTO 2010

I dati relativi alla prima fase dello studio hanno permesso la pubblicazione di un primo lavoro scientifico: M30 neoepitope expression in Epithelial cancer: quantification of apoptosis in circulating tumor cells by CellSearch analysis.

L'induzione dell'apoptosi è considerata un obiettivo primario di molte terapie targetted la cui rilevanza clinica nei tumori solidi rimane ancora da chiarire.

È stato sviluppato un test CTC integrato per la determinazione quantitativa delle CTC vitali/apoptotiche, allo scopo di utilizzarlo come marcatore di risposta al trattamento.

È stato dimostrato che un eccesso di CTC vitali (calcolato con la differenza dell'area sotto la curva dei grafici longitudinali delle CTC vitali e delle CTC apoptotiche) è associato con la ripresa radiologica della malattia, anche nei casi (carcinoma mammario) nei quali il trattamento aveva raggiunto l'obiettivo di ridurre il numero delle CTC al di sotto della soglia delle 5 CTC/μL.

In questo lavoro, oltre a pazienti affetti da carcinoma mammario, sono stati inseriti anche i pazienti dello studio pilota CTC/Sunitinib nel mRCC, in cui è stata dimostrata la presenza CTC (prima dimostrazione formale nel Ca renale).

I dati ottenuti in uno studio pilota nel Ca renale (in corso la scrittura del lavoro) confermano che il test integrato per la determinazione delle CTC vitali/apoptotiche è associato alla ripresa radiologica di malattia.

Infatti la PFS nei pazienti con DAUC<_0 è significativamente maggiore nel gruppo con DAUC>0.

Attività previste: L'obiettivo principale del progetto è valutare l'andamento delle CTC in un campione pilota di circa 8-12 pazienti con carcinoma renale avanzato in terapia in prima linea con sunitinib. Poiché è noto che i trattamenti anti-tumorali si associano a modificazione/selezione di cellule tumorali resistenti con maggiore potenzialità metastatiche, verranno arruolati solo pazienti mai esposti a precedenti trattamenti sistemici con chemioterapia, immunoterapia o analoghi inibitori delle tirosin-chinasi. Lo studio avrà carattere prospettico-descrittivo e potrà generare diverse ipotesi da cui partiranno studi ulteriori in pazienti affetti da tumori solidi tra cui il ca. prostatico, i tumori gastro-enterici e quelli mammari.

Successivamente, in relazione ai dati già ottenuti, si prevede di estendere lo studio ad una casistica più corposa. Per il triennio 2009-2011, si prevede il reclutamento di pazienti afferenti all'U.O. di Oncologia Medica sia con recente diagnosi di neoplasia maligna invasiva in follow-up dopo chirurgia radicale, che in trattamento medico adiuvante o palliativo. Considerando che sono

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

già pubblicati dati preliminari inerenti i tumori mammari, prostatici, gastroenterici e urinari, si ritiene di estendere il reclutamento oltre che alle precedenti categorie, anche a quelle appartenenti al gruppo dei tumori rari (rappresentano il 20% delle neoplasie maligne solide). Al termine del reclutamento previsto dopo un anno dall'approvazione da parte del Comitato Etico, si provvederà ad una analisi ad interim e, successivamente, dopo un follow-up medio di 3 anni, alla pubblicazione di un lavoro.

5 : Studio delle modificazioni epigenetiche a livello della cromatina telomerica nel reprogramming somatico e del loro effetto sulla trascrizione di RNA telomerico.

Responsabile: DE BONIS MARIA LUGIA

Programma:

Parole chiave: reprogramming delle cellule somatiche, terapia epigenetica, telomeri

Altri enti coinvolti: CNIO - CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLOGICAS - Madrid Spagna (prof. Maria Blasco)

Anno inizio: 2009

Durata: 36

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Altro

Descrizione: Il reprogramming nucleare di cellule somatiche è un processo che genera cellule pluripotenti a partire da cellule terminalmente differenziate. La possibilità di riprogrammare le cellule somatiche offre, pertanto, l'opportunità di disporre di una fonte pressoché illimitata di cellule pluripotenti paziente-specifiche per il trapianto autologo, consentendo il superamento di tutti i problemi di reperibilità/compatibilità normalmente associati a trapianti di tipo eterologo e nel trattamento di neoplasie a carico delle cellule ematiche.

La possibilità di ottenere cellule pluripotenti da tessuti adulti risolverebbe, inoltre, i problemi etici che attualmente sussistono riguardo l'opportunità di utilizzare embrioni come fonte di cellule staminali.

I telomeri sono strutture cromatiniche ribonucleoproteiche, altamente specializzate localizzate alle estremità terminali di ciascun cromosoma, che proteggono le estremità stesse da eventi accidentali di degradazione ricombinazione, fusione e rottura, prevenendo così fenomeni di instabilità cromosomica che possono predisporre allo sviluppo di neoplasie. La lunghezza dei telomeri dipende dall'attività della telomerasi, un enzima con attività di trascrittasi inversa in grado di aumentare il numero di ripetizioni TTAGGG, l'unità strutturale del DNA telomerico.

La lunghezza dei telomeri è stata da tempo associata all'invecchiamento cellulare: quanto più i telomeri si accorciano al procedere delle divisioni cellulari, tanto più la cellula si avvicina alla fase di senescenza e, quindi, alla sua eliminazione.

L'accorciamento dei telomeri non si verifica nelle cellule germinali e nella riserva di cellule staminali presente in ciascun tessuto adulto: in questi tipi cellulari un enzima, la telomerasi, provvede a mantenere i telomeri della lunghezza originale e previene l'invecchiamento cellulare. L'overespressione della telomerasi è infatti sufficiente a trasformare le cellule e renderle capaci di effettuare un numero indefinito di cicli.

Il mantenimento di un numero insolitamente alto di ripetizioni nel DNA telomerico è dunque in grado di svincolare le cellule dal normale percorso verso la senescenza e conferire loro la capacità di riprodursi indefinitamente.

In accordo con questa evidenza, negli ultimi anni è stato sviluppato con successo un numero crescente di strategie terapeutiche basate sull'inibizione della telomerasi in cellule neoplastiche. L'accorciamento dei telomeri che ne deriva non soltanto compromette la vitalità cellulare inducendo la cellula ad entrare in senescenza, ma è anche causa di una maggiore instabilità genetica che rende le cellule cancerose più suscettibili agli agenti citostatici classici.

Tra i fattori che regolano l'allungamento dei telomeri ci sono le modificazioni epigenetiche della cromatina telomerica, che risulta arricchita delle modificazioni istoniche tipiche dell'eterocromatina: tra queste, la trimetilazione della lisina 9 dell'istone H3 e della lisina 20 dell'istone H4.

È stato recentemente dimostrato che durante il reprogramming delle cellule somatiche i telomeri vengono efficientemente allungati e che la telomerasi è il maggior determinante di tale allungamento. In aggiunta, è stato riportato che i telomeri di cellule riprogrammate acquisiscono le modificazioni epigenetiche delle cellule staminali embrionali, associate ad una conformazione cromatinica più aperta.

1) Studio delle modificazioni epigenetiche a carico del DNA telomerico in topi knock-out per il gene che codifica la telomerasi (Terc -/-) durante il reprogramming. In questi animali la lunghezza dei telomeri diminuisce drasticamente al procedere delle generazioni. Tale sistema modello è dunque particolarmente adatto allo studio delle caratteristiche epigenetiche della

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

cromatina telomerica in topi *Terc*^{-/-} di prima (G1), seconda (G2) o terza (G3) generazione, a confronto con gli animali wild-type, in relazione alla lunghezza dei telomeri che, in assenza della telomerasi, diminuisce al procedere delle generazioni;

2) Studio del ruolo delle modificazioni epigenetiche nella trascrizione del DNA telomerico. È stato infatti riportato che, diversamente da quanto precedentemente ritenuto, il DNA telomerico è trascritto e genera piccoli RNA non tradotti (noti anche come TERRAs). La produzione di questi trascritti potrebbe essere regolata dalla combinazione di modificazioni epigenetiche a carico della cromatina telomerica. Allo scopo di caratterizzare le modificazioni epigenetiche della cromatina telomerica saranno eseguiti esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina con anticorpi che riconoscono le principali modificazioni istoniche;

3) Analisi delle modificazioni epigenetiche in cellule wild-type e knock-out per il gene che codifica la sirtuina 1 (*Sirt1*) nel corso del reprogramming. *Sirt1* è una proteina con attività di deacetilasi degli istoni ed è pertanto coinvolta nella regolazione della trascrizione e nella determinazione della struttura della cromatina. L'omologo di *Sirt1* nel lievito *S. Cerevisiae* è una proteina reclutata a livello del DNA telomerico; il suo ruolo nella biologia dei telomeri di mammifero è tuttavia ancora sconosciuto. Il presente progetto rientra nella tematica generale dello studio della biologia dei telomeri e del loro comportamento durante il reprogramming nucleare di cellule somatiche.

La possibilità di riprogrammare le cellule differenziate, restituendo loro la pluripotenza che hanno perduto nel corso del differenziamento, pone dunque importanti questioni a proposito del comportamento dei telomeri nel corso del processo. Il presente progetto si propone di chiarire alcuni di questi aspetti, soprattutto in relazione alle modificazioni epigenetiche che caratterizzano il DNA telomerico e a come queste ne regolino la trascrizione.

Risultati e prodotti conseguiti: Nel corso del 2009, è stato effettuato il protocollo di reprogramming, e il successivo isolamento di cloni di cellule staminali (IPS, Induced Pluripotent Stem cells) sulle linee cellulari di fibroblasti murini wild-type, knock-out e SuperSirt. In particolare, è stata analizzata la lunghezza dei telomeri in cloni di IPS a confronto con i fibroblasti parentali. I risultati ottenuti suggeriscono che la proteina *Sirt1* non è strettamente richiesta per il processo di reprogramming, dal momento che anche i fibroblasti deficienti per il gene sono perfettamente in grado di generare cloni di IPS. La lunghezza dei telomeri in queste cellule, tuttavia, sembra essere inferiore rispetto alle cellule wild-type. Questo risultato sembra suggerire che il processo di allungamento dei telomeri che accompagna il reprogramming avviene con minore efficienza rispetto a quanto accade nelle cellule osservate nelle cellule wild-type.

L'analisi della lunghezza dei telomeri è stata realizzata tramite la tecnica del Telomere Restriction Fragments analysis (TRF), che rivela il DNA telomerico attraverso un Southern blot con una sonda che riconosce specificamente il DNA telomerico, dopo digestione del DNA con un enzima di restrizione e separazione dei frammenti tramite elettroforesi in campo pulsato. Gli esperimenti di completamento dello studio sono tuttora in corso.

Aggiornamento 2010

In una prima fase del progetto è stato valutato il possibile ruolo della proteina *SIRT1* nella biologia dei telomeri, attraverso lo studio di Fibroblasti embrionali murini (MEF) che mancano del gene che codifica questa proteina (*SIRT1*^{-/-}) o che ne hanno una copia addizionale (*SIRT1*^{Super}). In queste cellule è stata analizzata la lunghezza telomerica ed è stato valutato l'accorciamento dei telomeri stessi al procedere delle divisioni cellulari.

La lunghezza telomerica è stata misurata attraverso due diverse tecniche: il TRF (Telomere Restriction Analysis) e la qFISH (quantitative Fluorescent in situ Hybridization). Nel TRF le cellule sono incluse in agarosio e sottoposte ad elettroforesi in campo pulsato per circa 26 ore. Dopo la separazione, gli acidi nucleici vengono trasferiti su membrana di nitrocellulosa e ibridati con una sonda radiomarcata, specifica per il DNA telomerico. Nella qFISH le cellule, trattate con colcemide che blocca la mitosi allo stadio di metafase, sono fissate con metanolo:acido acetico 3:1 e stratificate su vetrini da microscopio. Libridazione è effettuata con una sonda, marcata con un fluorocromo, specifica per il DNA telomerico e la fluorescenza, che è direttamente proporzionale alla lunghezza dei telomeri, è stata quantificata con l'aiuto di software specifici.

I risultati ottenuti mostrano che i livelli di proteina *SIRT1* sono in grado di influenzare la lunghezza telomerica: la mancanza di *SIRT1* è associata infatti a MEF con telomeri più corti, mentre la presenza di una copia addizionale della proteina non solo è associata ad una maggiore lunghezza telomerica, ma anche ad una minore erosione delle ripetizioni telomeriche dovuta all'età in tessuti di animali adulti. Un saggio enzimatico che misura l'attività della telomerasi ha inoltre dimostrato che questo effetto è direttamente dipendente dall'attività di questo enzima.

In una seconda fase del progetto, MEF derivati da embrioni di animali wild-type (*SIRT1*^{+/+}), *SIRT1*^{-/-} o *SIRT1*^{Super} sono stati sottoposti al processo di reprogramming, che ha generato cloni di IPS per ciascuna delle suddette linee cellulari. Il reprogramming è stato indotto tramite infezione con una miscela di vettori retrovirali che portano, ciascuno nel proprio capsido, uno dei 3 geni in grado di conferire la pluripotenza alle cellule (*Oct 3/4*, *Sox2* e *Klf4*). I cloni di cellule staminali, che appaiono dopo circa 10 giorni, sono stati trasferiti su un feeder layer di fibroblasti irradiati e amplificati tramite passaggi successivi.

La lunghezza telomerica è stata misurata nei cloni di IPS *SIRT1*^{+/+}, *SIRT1*^{-/-} e *SIRT1*^{Super}, a confronto con i fibroblasti

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

parentali, con le metodologie descritte precedentemente. I risultati ottenuti suggeriscono che la proteina SIRT1 non è strettamente richiesta per il processo di reprogramming, dal momento che anche i fibroblasti deficienti per il gene sono perfettamente in grado di generare cloni di IPS. La lunghezza dei telomeri in queste cellule, tuttavia, sembra essere inferiore rispetto alle cellule SIRT1+/+. Questo risultato suggerisce che il processo di allungamento dei telomeri, che accompagna normalmente il reprogramming, avviene con minore efficienza in cellule SIRT1-/- rispetto a quanto accade nelle cellule SIRT1+/+. Tuttavia, nessun incremento nell'efficienza di reprogramming è stato osservato in cellule SIRT1Super rispetto alla controparte wild-type.

L'analisi citogenetica degli stessi vetrini preparati per la qFISH ha inoltre mostrato che le cellule SIRT1-/- hanno una tendenza maggiore, rispetto alle cellule SIRT1+/+, ad accumulare aberrazioni cromosomiche, indicando un possibile ruolo di questa proteina nella stabilità genomica.

Nei cloni di IPS SIRT1+/+ e SIRT1-/-, a confronto con i fibroblasti parentali, è stata inoltre analizzata la trascrizione di RNA messaggero a partire dal DNA telomerico. È stato recentemente dimostrato, infatti, che il DNA telomerico, sebbene marcatamente eterocromatico, è attivamente trascritto e genera RNA non tradotti, denominati TERRAs, che non lasciano mai il nucleo e la cui funzione non è ancora chiara.

Nel corso del reprogramming di cellule SIRT1+/+ la trascrizione dei TERRAs, analizzata attraverso la tecnica del Northern blot, aumenta significativamente, mentre nelle cellule SIRT1-/- questo aumento non si verifica. L'analisi della trascrizione dei TERRAs in cellule SIRT1Super, prima e dopo l'induzione del reprogramming, è attualmente in corso.

Attività previste Metodologie sperimentali

Reprogramming nucleare

Il reprogramming nucleare sarà condotto su fibroblasti embrionali murini (MEF) derivati da embrioni di animali wild-type o knock-out per il gene della telomerasi o per quello che codifica Sirt1. Il reprogramming sarà indotto tramite infezione con una miscela di vettori retrovirali che portano, ciascuno nel proprio capsido, uno dei 3 geni in grado di conferire la pluripotenza alle cellule (Oct 3/4, Sox2 e Klf4). Dopo l'infezione, le cellule saranno tenute in terreno di coltura specifico per le cellule staminali. I cloni di cellule staminali, che dovrebbero cominciare ad essere visibili dopo circa 10 giorni, saranno trasferiti su feeder cells e amplificati tramite passaggi successivi.

Analisi della lunghezza dei telomeri

La lunghezza dei telomeri sarà stimata attraverso due diversi saggi:

TRF (Telomere Restriction Analysis)

Le cellule saranno incluse in agarosio e sottoposte ad elettroforesi in campo pulsato per circa 23 ore. Dopo la separazione, gli acidi nucleici saranno trasferiti su membrana di nitrocellulosa e ibridati con una sonda radiomarcata, specifica per il DNA telomerico. La rivelazione sarà effettuata tramite autoradiografia.

Q-FISH (Quantitative Fluorescent in situ hybridization)

Le cellule, trattate con colcemide che blocca la mitosi allo stadio di metafase, saranno risospese in tampone ipotonico e fissate con metanolo:acido acetico 3:1 prima di essere stratificate su vetrini da microscopio. Libridazione sarà effettuata con una sonda, marcata con un fluorocromo, specifica per il DNA telomerico e la fluorescenza, che è direttamente proporzionale alla lunghezza dei telomeri, sarà quantificata con l'aiuto di software specifici.

Immunoprecipitazione della cromatina

Le cellule saranno fissate con formaldeide, lisate e sonicate allo scopo di ottenere frammenti di cromatina della lunghezza massima di 1 kb. La cromatina sarà dunque incubata con anticorpi che riconoscono le principali modificazioni istoniche associate alla regolazione della trascrizione (H3K9me3, H4K20me3, H3K9ac, H4ac). Dopo l'immunoprecipitazione, il DNA sarà estratto e analizzato attraverso ibridazione, con una sonda radiomarcata specifica per il DNA telomerico, e autoradiografia.

6 : Studi Genetici e Molecolari sulla DNA Topoisomerasi I Umana ed analisi delle Mutazioni che provocano resistenza alla farmacoterapia oncologica con gli analoghi della Camptotecina

Responsabile: Losasso Carmen

Programma:

Parole chiave: DNA, Topoisomerasi I umana, analoghi della Camptotecina, polimorfismi genetici

Altri enti coinvolti: Prof. Pietro Benedetti - Dipartimento di Biologia, Università degli studi di Padova Prof. Giuseppe Zagotto - Istituto di Farmacologia, Università degli Studi di Padova Prof. Stefano Moro - Istituto di Farmacologia, Università degli Studi di

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Padova Prof. Mary-Ann Bjornsti - University of Alabama, Birmingham, AL

Anno inizio: 2009

Durata: 36

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Altro

Descrizione: Lo studio della DNA Topoisomerasi I umana riveste un ruolo rilevante in campo oncologico dal momento che questo enzima è l'unico bersaglio cellulare di una classe di farmaci antitumorali noti come Camptotecine (CPT) (1). La DNA topoisomerasi I eucariotica è un enzima monomero che promuove i cambiamenti di topologia del DNA. La sua attività catalitica è un processo che si compone di varie fasi e comprende il taglio del DNA, la formazione di un legame covalente tra la Tyr del sito attivo e l'estremità 3'OH del filamento scissile del DNA, la rotazione e la riligazione dello stesso (2). Durante questi steps l'enzima subisce grandi variazioni conformazionali senza alcuna richiesta di energia, dalla forma aperta che favorisce il legame del DNA alla forma chiusa, osservabile con diffrazione a raggi X, in cui l'enzima avvolge completamente il DNA.

Studi cristallografici su un frammento C-terminale da 70 KDa di hTop1p legata ad un duplex di DNA, hanno rivelato che la proteina è costituita da due lobi che avvolgono il DNA attraverso una serie di interazioni. I due lobi sono collegati da una lunga alpha-elica, che contiene il putativo perno che si pensa essere necessario per l'apertura e la chiusura dell'enzima. In posizione opposta, due anse (dette "lips") interagiscono tra loro attraverso sei amminoacidi e un ponte salino per chiudere l'enzima intorno al DNA. Perché l'enzima leghi il DNA sono richiesti cambiamenti conformazionali sostanziali, mentre il DNA necessita di distorsioni per poter ruotare all'interno dell'enzima.

La struttura tridimensionale della Top1B umana, in complesso con un oligonucleotide di 22bp, ha evidenziato che l'enzima è organizzato in domini multipli che circondano il DNA come una tenaglia. I quattro domini sono: la regione N-terminale altamente carica, il dominio "core", il dominio linker carico positivamente e il dominio C-terminale contenente la Tyr catalitica. La porzione N-terminale, che può essere deleta se presente aumenta l'attività di rilassamento della Top1 proponendosi come candidata nella regolazione della rotazione del filamento. Questo dominio è poco strutturato e tanto flessibile da non essere stato ancora cristallizzato. Il confronto tra enzima WT e Topo70 dimostra il ruolo dell'N-terminale nell'incrementare l'affinità dell'enzima al DNA. In particolare, i residui posizionati in questo dominio promuovono l'interazione con il DNA a valle del sito di taglio. Per questo dominio è stato ipotizzato un ruolo anche nel controllo dell'apertura e della chiusura della Top1, dal momento che la regione contenente il Trp205 interagisce con residui chiave della regione del "perno".

L'apertura e la chiusura dell'enzima può avvenire anche senza DNA, come abbiamo precedentemente dimostrato, dal momento che è possibile indurre la formazione di un ponte disolfuro in assenza del DNA, quando due residui delle "lips" sono mutati in cisteina. In ogni caso, per la difficoltà di cristallizzazione dell'enzima in assenza del suo substrato, non si hanno informazioni sulla struttura cristallografica della proteina libera dal DNA (3).

Anche se è noto che le DNA Topoisomerasi hanno un ruolo nella trascrizione di mRNA e rRNA, nella sintesi del DNA, nel suo riparo e nella ricombinazione, rimane ancora poco chiaro il meccanismo attraverso il quale questi enzimi sono coinvolti in ciascuno dei processi elencati e quale sia la natura delle interazioni che essi stabiliscono con le altre proteine cellulari (4).

Anche se non necessario per l'attività in vitro, il dominio N-terminale contiene 5 segnali di localizzazione nucleare e differenti siti di interazione con altre proteine coinvolte in diversi aspetti del metabolismo cellulare (2). Recenti esperimenti hanno dimostrato che, nel contesto della replicazione, Top1 agisce in una regione di 600bp nei pressi della forca di replicazione (5). Questi dati mostrano la possibile azione di Top1 nel contenere l'accumulo di stress torsionale alla forca di replicazione, prevenendo la diffusione di cambiamenti topologici in lunghi tratti cromosomici.

HTop1p è maggiormente coinvolta nel risolvere strutture topologiche collegate con l'allungamento della trascrizione, dal momento che l'enzima si accumula nel nucleolo durante la trascrizione dell'rDNA. Nelle cellule, la proteina è ridistribuita tra i compartimenti nucleolare e nucleoplasmico. Nel nucleoplasma, hTop1p risolve lo stress topologico associato alla trascrizione dei geni dipendente dalla RNA polimerasi II e dal movimento delle forche replicative. Poco è noto sulla natura dell'interazione con gli altri componenti molecolari di questi processi.

Htop1p può reprimere o stimolare la trascrizione in presenza di attivatori della trascrizione attraverso interazioni fisiche proteina-proteina. Non sono state fornite indicazioni dirette del ruolo della Topoisomerasi I nella mitosi, i possibili ruoli sono stati ipotizzati sulla base degli studi genetici condotti con *S.cerevisiae* per la cui condensazione cromosomica è richiesta l'attività dell'enzima hTop1p.

In ogni caso, la capacità di risolvere problemi topologici potrebbe essere richiesta per il corretto compattamento delle fibre di cromatina durante il processo mitotico (6-10).

Al fine di studiare lazione svolta dalla regione hinge, in primo luogo è stato mutato il residuo Pro 431 in Gly, inserendo un

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Risultati e prodotti conseguiti: aminoacido privo di catena laterale, per verificare se mutazioni a carico dell'ipotetico perno possano influenzare e/o alterare l'attività catalitica. Le sostituzioni sono state scelte, nel caso dell'alaniina, per alterare l'ambiente chimico sia in termini sterici che elettrostatici, mentre per quanto riguarda la cisteina per la capacità di formare ponti di zolfo. Tutti i mutanti sono stati

ottenuti attraverso mutagenesi sito-specifica e realizzati sia nella versione intera che in quella privata del dominio N-terminale (70) al fine di verificare se l'assenza di questa regione possa alterare l'attività catalitica delle varie proteine. I geni htopP431G, htopP431G-70, htopR434A, htopR434A-70, htopR434C, htopR434C-70, htop1W205C, htop1W205C-70 e htop70 sono stati clonati in un vettore per l'espressione di proteine in lievito che presenta modalità di replicazione a singola copia. I geni sono stati posti sotto il controllo trascrizionale del promotore inducibile GAL4, in modo da attivarne l'espressione a piacimento. Si è deciso di procedere con lo studio dei mutanti full length riservandosi di procedere con lo studio dei mutanti deleti del dominio N-terminale in un secondo momento.

I dati ottenuti con Spot-test confermano che la Top1 è l'unico bersaglio cellulare della CPT e che mutanti resistenti all'azione dell'inibitore come mutante T729E continuano a formare colonie anche in presenza di alte concentrazioni di CPT.

La vitalità manifestata dai mutanti della regione hinge e la loro sensibilità all'azione della CPT indicano che le mutazioni introdotte non hanno modificato strutturalmente la regione dell'enzima deputata all'interazione e all'intercalazione del farmaco.

Le proteine Top1, htop1P431G, htop1R434A, htop1R434C e htop1W205C sono state sottoposte ad un saggio di rilassamento del DNA allo scopo di valutare l'eventuale cambiamento di attività catalitica dovuto all'introduzione delle mutazioni descritte precedentemente. Uguali quantità di ciascuna proteina e diluizioni seriali delle stesse sono state incubate con DNA superavvolto negativamente. I prodotti di reazione sono stati risolti in un gel di agarosio monodimensionale, colorati con etidio bromuro e visualizzati mediante transilluminatore.

Tutti i mutanti analizzati presentano un'attività specifica inferiore rispetto alla proteina WT. Altra particolarità che emerge dall'analisi dei prodotti di reazione è la diversa distribuzione dei topoisomeri nei prodotti delle reazioni di rilassamento operate dai vari mutanti.

Per stimare l'affinità dei mutanti per il DNA sono stati condotti alcuni saggi di rilassamento a diverse forze ioniche. Mentre il mutante P431G mostra attività catalitica in un intervallo di forze ioniche paragonabile a quello del WT, i mutanti R434A, R434C e W205C mostrano un diverso comportamento. In particolare l'intervallo di forze ioniche in cui si apprezza attività catalitica è estremamente ristretto per gli enzimi mutanti R434C e W205C. Questo risultato lascia pensare che la mutazione dell'hinge in posizione 534 o la mutazione dell'N-terminale, nella posizione attigua all'hinge (W205) nella disposizione tridimensionale dell'enzima, alterano la capacità dell'enzima di rilassare i superavvolgimenti negativi

Aggiornamento 2010

Il progetto ha previsto l'analisi strutturale dell'enzima attraverso la tecnica del molecular modelling allo scopo di individuare siti putativamente coinvolti nella definizione del verso di rotazione del DNA. Sono stati individuati e mutati attraverso mutagenesi sito-specifica tre possibili residui e i geni sono stati clonati in un vettore per l'espressione di proteine in lievito, che presenta modalità di replicazione a singola copia. In questo modo è stato possibile studiare l'espressione basale dei geni di interesse e valutarne il fenotipo in ceppi di lievito deleti per il gene della Topoisomerasi I endogena. I geni sono stati posti sotto il controllo trascrizionale del promotore inducibile GAL4, in modo da attivarne l'espressione a piacimento. È stato condotto un test di farmaco-sensibilità in vivo allo scopo di analizzare la vitalità di ceppi di lievito trasformati con diversi plasmidi, esprimenti le proteine d'interesse, e valutare la capacità degli stessi di formare colonie in presenza o meno di veleni selettivi come la Camptotecina (CPT) e i farmaci antitumorali suoi derivati. I mutanti ottenuti sono risultati essere ipersensibili al farmaco se confrontati con i livelli di sensibilità dell'enzima wild type. Un saggio in vivo in *S.cerevisiae* ha confermato l'ipersensibilità delle proteine di interesse alla CPT.

La vitalità manifestata dai mutanti e la loro ipersensibilità all'azione della CPT indicano che le mutazioni introdotte non hanno modificato strutturalmente la regione dell'enzima deputata all'interazione e all'intercalazione del farmaco ma che, probabilmente si sta assistendo ad un cambiamento nella geometria dell'interazione della DNA Topoisomerasi con il proprio substrato specifico, il DNA superavvolto.

Le proteine mutanti sono state purificate e il loro ciclo catalitico studiato con dettaglio molecolare, utilizzando quale substrato DNA negativamente superavvolto, DNA positivamente superavvolto e frammenti di DNA lineari marcati radioattivamente.

Il primo esperimento è stato il confronto tra l'attività specifica dei mutanti e quella del wild type nel rilassare molecole di DNA. I risultati hanno ampiamente dimostrato la capacità dei mutanti di mantenere inalterata l'attività catalitica globale. Per stimare l'affinità dei mutanti per il DNA sono stati condotti alcuni saggi di rilassamento a diverse forze ioniche in condizioni di diluizione seriale di ordine 10. Gli esperimenti condotti a basse forze ioniche avevano lo scopo di valutare una eventuale diminuzione dell'affinità degli enzimi mutati per il DNA mentre gli esperimenti condotti a forze ioniche elevate

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

avevano lo scopo di valutare eventuali problemi strutturali di misfolding degli enzimi mutati. Gli esperimenti sono stati condotti con DNA sia positivamente che negativamente superavvolto ed hanno rivelato la presenza di un mutante in grado di discriminare il segno del superavvolgimento del DNA, essendo in grado di rilassare correttamente solamente il DNA positivamente superavvolto.

Sono stati condotti saggi di affinità dell'enzima a molecole di DNA a doppio filamento linearizzate allo scopo di calcolare la costante di affinità per il substrato e confrontarla con quella calcolata per l'enzima WT ed è stato appurato che la diversa affinità dei mutanti al DNA è strettamente dipendente dalla struttura tridimensionale del substrato e non dipende dalla sequenza nucleotidica. Gli esperimenti fin ora condotti ci permettono di speculare sul fatto che il segno del superavvolgimento del DNA abbia un ruolo determinante nel favorire la stabilità del complesso ternario Topoisomerasi-DNA-CPT, giustificando la diversa efficacia del farmaco nei diversi momenti del metabolismo cellulare.

Essendo i dati molto riproducibili, il progetto continuerà con la verifica della diversa attività catalitica di questi mutanti in un saggio di rilassamento del DNA in vivo, utilizzando cellule di lievito delete del gene endogeno della DNA Topoisomerasi I ed esprimenti una DNA Topoisomerasi II temperatura-sensibile.

Le principali difficoltà del progetto sono consistite nella produzione delle molecole di DNA positivamente superavvolte e nella messa a punto di saggi di attività in vivo.

Per quanto riguarda la prima problematica il procedimento comporta oneri temporali dal momento che implica la produzione dell'enzima Reverse Gyrase di Archeobatterio attraverso espressione eterologa.

La messa a punto di saggi in vivo pone anch'essa dei limiti temporali, dal momento che i ceppi di lievito utilizzabili per l'esperimento hanno cicli cellulari molto lunghi e sono estremamente sensibili a piccole variazioni di temperatura oltre che dotati di elevata capacità revertante. Il progetto ha presentato, inoltre, oneri economici elevati a carico del Laboratorio del Prof. Benedetti, essendo molto costosi i materiali utilizzati.

Attività previste Task 1. Recentemente sono state descritte le differenze nel meccanismo di rilassamento dei superavvolgimenti positivi e negativi ad opera della Top1 in presenza del farmaco antitumorale CPT e del suo analogo topotecano (11). Il topotecano ostacola in modo significativo il rilassamento del DNA promosso dalla Top1 con una inibizione che risulta maggiore sui superavvolgimenti positivi rispetto ai negativi. Esperimenti in vivo condotti su *S. cerevisiae* dimostrano che i superavvolgimenti positivi si accumulano durante la trascrizione e la replicazione in conseguenza dell'inibizione della Top1 da parte della CPT. Questi dati suggeriscono un meccanismo citotossico per CPT in cui l'accumulo di superavvolgimenti positivi davanti all'apparato di replicazione genera lesioni potenzialmente letali. Per questo motivo un mutante della Top1 capace di rilassare un solo tipo di superavvolgimenti (positivi o negativi) potrebbe essere utile per capire il suo ruolo nella replicazione e nella trascrizione. Recentemente un lavoro di simulazione ha individuato alcuni residui che potrebbero influenzare la direzionalità del processo di rilassamento (20). Per questo vorremmo mutare due regioni dell'enzima e isolare dei mutanti che siano in grado di rilassare preferenzialmente superavvolgimenti positivi o negativi. Le regioni dell'enzima che saranno mutagenizzate sono l'"hinge" e il "nose cone". La regione dell'"hinge" è costituita da una alfa elica contenente i residui (431-453) dal momento che recentemente è stato ipotizzato che questa regione sia responsabile dello stiramento subito dall'enzima durante il rilassamento dei superavvolgimenti negativi (21). Saranno condotti saggi di rilassamento con substrati positivamente e negativamente superavvolti, saggi di taglio in vitro e saggi di legame dell'enzima al DNA.

Task 2. La progressione della forza replicativa genera superavvolgimenti positivi a monte dell'apparato di replicazione e negativi a valle. Durante questo processo il DNA è così superavvolto che se non si avesse una rimozione dello stress torsionale si verificherebbe il blocco della replicazione. Tale evento è prevenuto dall'azione della Top1 che mediante tagli a singolo filamento promuove il rilassamento del DNA. La modulazione della topologia in prossimità delle origini di replicazione gioca un ruolo essenziale nell'origine del gene della lamina B2 umana, infatti la Top1 interagisce in modo specifico con questa regione secondo modalità regolate dal ciclo cellulare (5). Le topoisomerasi giocano un ruolo fondamentale anche nell'attivazione e disattivazione delle origini stesse, la TopII probabilmente contribuisce a creare e mantenere uno stato topologico che consenta l'assemblaggio del complesso pre-replicativo mentre la TopI promuove i cambiamenti topologici necessari all'inizio e alla bidirezionalità della sintesi (8). È stato dimostrato in *S. cerevisiae* che la Top1 fa parte del "Complesso di Progressione del Replisoma". I componenti del replisoma che preservano la stabilità genomica garantendo la progressione della forza replicativa sono poco conosciuti. In questo contesto l'analisi fisica e funzionale delle interazioni tra Top1 e le altre proteine del complesso è fondamentale. Le proteine dell'"Unwindsome Complex" (6), espresse eterologicamente in *E. coli* ci saranno fornite dal laboratorio della Dr. Francesca Pisani del CNR e noi vogliamo usarle per verificare la presenza di possibili interazioni con la Top1. Usando la microscopia elettronica ad alta risoluzione su singola molecola possiamo individuare le interazioni di Top1 con ciascuna delle proteine di interesse in presenza e in assenza di DNA. In questa maniera saremo in grado di dimostrare se l'enzima si lega specificamente a una o a più subunità del complesso di replicazione e se il binding è aumentato in presenza di sequenze specifiche. Anticorpi specifici per i singoli componenti dell'"unwindsoma" ci permetteranno

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

di individuare ciascun componente del complesso generale osservato al microscopio elettronico.

Task 3. Sono stati usati molti metodi per studiare il legame della Top1 al DNA e tra questi la microscopia elettronica ha suggerito che l'enzima, sebbene non sia necessario per il suo meccanismo d'azione, può legarsi alle intersezioni di una molecola superavvolta (write) (22). E' stato osservato che la Top1B di Pox Virus, una topoisomerasi sito specifica, si dispone sul filamento di DNA in maniera cooperativa (23). Questi risultati suggeriscono una forte interazione proteina-proteina della Top1 con se stessa. Il nostro interesse in questo progetto è quello di studiare il legame della Top1 umana al DNA usando come substrato sequenze specifiche che contengono origini di replicazione (come quella del gene della Lamina B2). E' importante determinare in che modo la proteina si lega al DNA, quante molecole possono legarsi ad una sequenza singola o se una o più molecole si legano ad un cluster di sequenze ripetute. Quale DNA substrato useremo un plasmide che contiene sequenze di origine di replicazione ripetute. Il plasmide conterrà anche una sequenza fortemente piegata delle dimensioni di 200bp derivante dal tripanosomatide *Crithidia fasciolata* che è considerata tra le sequenze più piegate tra quelle studiate fin ora (24). Questa sequenza, insieme a tagli di restrizione specifici, orienterà il plasmide in maniera non ambigua per determinare le posizioni di legame dell'enzima rispetto alle origini di replicazione. Come è stato dimostrato precedentemente, il DNA piegato orienta la geometria di un plasmide superavvolto. Infatti la sequenza piegata tende ad occupare la parte apicale di un DNA circolare e per questo motivo le intersezioni delle due doppie eliche del DNA conterranno circa le stesse sequenze (25). In questa maniera ci sarà possibile studiare il binding specifico dell'enzima anche su molecole superavvolte. All'inizio saranno utilizzati classici metodi di preparazione come la colorazione negativa e il "rotary shadowing" (26) e in un secondo momento useremo la cryo-ultra microscopia accoppiata all'analisi delle immagini, metodologia questa, recentemente usata per la ricostruzione tridimensionale di cerchi di DNA di 150bp (27).

Task 4. Per quanto riguarda lo studio prospettico dei polimorfismi delle Top1 che provocano resistenza agli analoghi della CPT si procederà come segue.

100 pazienti pre-trattati con CPT, con carcinoma del colon avanzato o metastatico saranno selezionati in un studio prospettico multicentrico. Tutti i pazienti forniranno il consenso informato scritto secondo le regole del locale comitato etico istituzionale. I pazienti saranno sottoposti a biopsia prima del trattamento con irinotecan (CPT-11). Una seconda biopsia sarà effettuata dopo otto cicli di terapia, in caso di parziale remissione o di progressione della malattia. La biopsia non verrà eseguita in caso di risposta completa. Usando criteri RECIST, la tomografia computerizzata delle immagini sarà effettuata ogni otto settimane. I pazienti con diminuzione del 30% del tumore dopo almeno 6 settimane saranno classificati come responders. I pazienti con scomparsa completa della massa del tumore saranno classificati come aventi risposta completa; il progresso eventuale della malattia sarà definita con un aumento del 20% della somma dei diametri delle lesioni in osservazione oppure con la comparsa di nuove metastasi. Il presente studio è diretto a definire due gruppi di pazienti. Nella coorte dei non responders, si studierà specificamente il fenotipo di resistenza ai trattamenti chemioterapici. Frammenti di DNA genomico saranno estratti dai campioni di paraffina utilizzando tecniche standard. Reazioni a catena della polimerasi (PCR) verranno eseguiti su 40 ng di DNA genomico con primers determinati partendo dalla sequenza genica di hTop1 (NT_011362) in modo da coprire l'intera sequenza degli esoni. I prodotti di PCR saranno sottoposti a dHPLC al fine di individuare i campioni di DNA eterozigoti per Top1. Seguirà il sequenziamento dei prodotti della PCR.

I polimorfismi di Top1 saranno studiati nel contesto della nota struttura cristallografica della proteina. E' noto che la maggior parte delle mutazioni resistenti CPT si trovano vicino al sito attivo, o nel sito di interazione dell'enzima con la CPT ma la nostra esperienza suggerisce che altre mutazioni potrebbero essere ubicate lontano dal sito attivo (come nel caso di Ala653Pro, Glu418Lys, Thr729Ala/Ile/Pro/Lys/Glu) (3,13,14,15,16), influenzando la dinamica delle interazioni proteina-farmaco e la modifica delle interazioni intradominio.

Lo studio dell'ingresso e della stabilità del farmaco nel complesso ternario CPT-DNA-Top1 sarà effettuata mediante spin-labeling (SDSL) sito diretta combinato con la spettroscopia EPR, che rappresenta un potente strumento per l'individuazione dei cambiamenti strutturali.

Infine lavoreremo al disegno molecolare di nuovi analoghi della CPT più efficaci e mirati verso Top1. Queste molecole saranno testate in silico in vitro per la loro capacità di superare la resistenza alla CPT delle mutazioni di Top1.

7 : Analisi di polimorfismi genetici e rischio di neoplasia

Responsabile: TRAFICANTE ANTONIO

Programma:

Parole chiave: Polimorfismo genetico, Tumori solidi, XRCC1, XRCC3, GSTM1, NAT2, CYP1A1, CYP2E1, BCL2, UGT1A1, DPYD

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Altri enti coinvolti: Patologia Generale Università Cattolica di Roma, Agrobios di Metaponto, Ospedale Madonna delle Grazie di Matera.

Anno inizio: 2009

Durata: 24

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Descrittiva

Descrizione: La popolazione umana è esposta quotidianamente a sostanze potenzialmente dannose. La maggior parte di queste sostanze è presente sotto forma di miscele complesse anziché di molecole singole e molti tumori sono associabili alla loro esposizione. Inoltre è osservazione comune che soggetti similmente esposti ad agenti cancerogeni mostrano esiti assai diversi. E noto che esistono geni che si presentano nella popolazione sotto diverse forme alternative con frequenze molto elevate (polimorfismi genetici) e che vengono quindi ereditati, ma con effetti funzionali relativamente modesti che incrementano il rischio di cancro con meccanismi molto diversi. Questi geni polimorfici causano una suscettibilità genetica al cancro, quasi sempre condizionata all'esposizione ad un agente cancerogeno. Quindi, i soggetti con specifici polimorfismi in questi geni non ereditano la malattia, ma la suscettibilità a svilupparla in determinate condizioni di esposizione ambientale o professionale ad agenti cancerogeni. Gli studi epidemiologici mostrano che l'80-90% di tutti i cancri sono relazionati a fattori ambientali come fumo, esposizioni professionali, dieta. Si conoscono oggi almeno 80 geni polimorfici diversamente coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici (sostanze estranee alla vita). La maggior parte dei cancerogeni richiede l'attivazione metabolica nel corpo umano per poter sviluppare effetti tossici. Due principali sistemi enzimatici, classificati come enzimi di fase I e di fase II, possono metabolizzare cancerogeni sia sintetici o naturali nell'organismo. In generale, gli enzimi di fase I sono in grado di attivare direttamente le sostanze cancerogene e produrre metaboliti attivi, mentre gli enzimi di fase II hanno un effetto disintossicante e favoriscono la completa eliminazione della sostanza. Gli enzimi di fase I studiati comprendono la famiglia dei citocromi P450 (CYP) e in particolare Cyp 1A1 e Cyp 2E1, quelli di fase II, invece, enzimi di coniugazione come GST e NAT. Inoltre, eventuali lesioni prodotte dagli xenobiotici sul DNA, possono andare incontro ad estesi processi riparativi, a loro volta sotto controllo genetico. Anche per questa cruciale fase sono coinvolti centinaia di geni i cui polimorfismi possono essere associati al fenomeno della cancerogenesi. Nel corso dell'evoluzione si sono sviluppati molti meccanismi per riparare i diversi tipi di danno al DNA e per mantenere l'integrità del genoma ed è stato dimostrato che individui che mostrano una capacità di riparazione severamente compromessa possiedono aumentati tassi di mutazione, instabilità genomica e un aumentato rischio di manifestare cancro. Diversi lavori, basati su studi caso-controllo, hanno fornito informazioni consistenti riguardo a una possibile relazione tra le varianti polimorfiche presenti nei geni di riparo e il rischio di manifestare il cancro. Sono stati identificati parecchi polimorfismi (e collegati alla suscettibilità al cancro) in geni che partecipano alle vie di riparo del DNA, in particolare quelli da noi studiati sono stati XRCC1 e XRCC3.

Risultati e prodotti conseguiti: Sono stati valutati i risultati relativi all'analisi di GSTM1 e NAT2, i cui polimorfismi sono stati precedentemente associati al rischio individuale di sviluppare il cancro. Nell'ambito di uno studio caso-controllo, ad oggi, sono stati analizzati 92 pazienti affetti da tumore del colon, 75 del polmone 23 della vescica e 121 individui sani. Una analisi preliminare dei dati suggerisce che il gene GSTM1 possa avere un ruolo importante nello sviluppo del tumore del colon, soprattutto per il sesso femminile e nei casi di insorgenza al di sotto dei 65 anni di età, mentre potrebbe non avere un ruolo altrettanto importante per lo sviluppo di altri tipi di neoplasie, quali il tumore del polmone e della vescica, probabilmente più sensibili ai fattori ambientali o ad altri fattori genetici. Per quanto concerne l'altro gene studiato, NAT2, i nostri dati mostrano una maggiore espressione del fenotipo acetilatore lento tra i campioni oncologici nella loro totalità rispetto agli individui sani che, al contrario, esprimono maggiormente il fenotipo acetilatore rapido.

Un secondo studio si propone di valutare le mutazioni delle regioni codificanti e non del gene Bcl2 (di 6 promotori P1, P2, P3, P4, P5, P6 e di 3 esoni ex2a, ex2b, ex2c, ex3) in pazienti affetti dal tumore della prostata. A questo studio hanno collaborato l'Università Cattolica di Roma, l'Agrobios di Metaponto e l'IASL n. 4 di Matera. Sono stati ad oggi reclutati ed analizzati, con tecniche di PCR, elettroforesi e DHPLC, 65 pazienti con diagnosi di carcinoma della prostata, 29 pazienti con diagnosi di ipertrofia prostatica benigna e non (istologia) e 94 controlli. I nostri risultati confermano in parte quanto già presente in letteratura, documentando, altresì, l'esistenza di una nuova mutazione nel promotore 4 indicata come 646 G>C in omozigosi.

Un terzo studio sui polimorfismi ha comportato la selezione di 70 pazienti con tumore del colon retto dalla banca di DNA

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

presente nel laboratorio di Oncologia molecolare e di cui sono state raccolte informazioni dalle cartelle cliniche sulla risposta al trattamento ai chemioterapici (50 pts trattati con Irinotecano e 70 pts trattati con 5-FU) sia in termini di efficacia che di tossicità. Lo studio ha comportato l'amplificazione di 23 regioni codificanti e non del gene DPYD e dell'amplificazione della TATA box del gene UGT1A1. Si è proceduto poi, allo screening mutazionale dei campioni amplificati mediante la DHPLC e le mutazioni rilevate sono state identificate tramite sequenziamento in collaborazione con IAGROBIOS di Metaponto. Tutte le mutazioni riscontrate sono state confermate dai dati della letteratura; sono state inoltre riscontrate nuove mutazioni, come la sostituzione 141 G>A nellesone 2 e la delezione 240-242 delGAA nellesone 4. Sembra anche esistere una diretta correlazione tra mutazione e tossicità dovuta all'uso del 5-FU; infatti almeno il 60% dei pazienti che presentano mutazione hanno una tossicità a tale farmaco.

Una ulteriore linea di ricerca, condotta in collaborazione con l'Università Cattolica di Roma, ha comportato la messa in coltura di linee cellulari prostatiche androgeno-indipendenti (PC3), nelle quali abbiamo studiato l'espressione di siRNA per NF- κ B dopo trasfezione transiente in linee cellulari di prostata androgeno-indipendenti PC3. Le cellule PC3 sono state coltivate con metodo standard e trasfettate con il costrutto contenente il gene NF- κ B e con il costrutto di controllo mancante del c-DNA per NF- κ B (scramble o controllo sperimentale) necessario per distinguere il silenziamento sequenza-specifica dagli effetti sequenza- non specifica. È stata valutata l'efficienza di trasfezione (numero di cellule effettivamente trasfettate sul numero di cellule vitali), determinata dal gene reporter GFP (Green Fluorescence Protein), la cui concentrazione utilizzata (1 μ g) è stata sufficiente a garantire una buona efficienza di trasfezione. Abbiamo osservato che le PC3 aumentavano quando si utilizzava una concentrazione di siRNA di 1 μ g alle 48 ore dalla trasfezione rispetto al controllo e tale dato veniva confermato con il test di vitalità cellulare. Mediante Real-time PCR è stata effettuata la quantizzazione genica di NF- κ B ed è stata valutata l'espressione proteica mediante analisi immunocitochimica e di Western-blot. Abbiamo osservato, attraverso esperimenti di RT-PCR e confermati poi da Real-Time PCR, che la down-regolazione di NF- κ B determina un significativo silenziamento dei livelli di c-DNA in confronto alle cellule di controllo. Mediante analisi citofluorimetriche sono state inoltre valutate il ciclo cellulare delle PC3 e l'apoptosi; analizzando le variazioni nella progressione del ciclo cellulare al FACS, sono stati misurati la diminuzione della proliferazione, il blocco del ciclo cellulare in corrispondenza del checkpoint G0/G1-S, seguiti dal distacco delle cellule dal substrato e dall'induzione di apoptosi (morte cellulare programmata). Tutti questi esperimenti hanno dimostrato che la down-regolazione di NF- κ B tramite RNAi determina da una parte, un rallentamento della proliferazione di cellule tumorali prostatiche e le rende suscettibili all'apoptosi; dall'altra, determina una significativa riduzione dell'espressione proteica. Perciò si può ipotizzare che NF- κ B abbia un possibile ruolo pro-apoptotico e che sia un gene ad azione lenta con effetti antiproliferativi in grado di indurre apoptosi nelle cellule tumorali prostatiche. Inoltre, i nostri risultati suggeriscono che l'espressione del gene NF- κ B nelle cellule PC3 sia, almeno in parte, sotto il controllo di una regolazione tradizionale.

Un ultimo lavoro riguarda i polimorfismi genetici degli enzimi di fase I del metabolismo degli xenobiotici (Cyp 1A1, Cyp 2E1) e del gene di riparo XRCC1 in pazienti affetti da vari tipi di tumore afferenti all'IRCCS di Rionero in Vulture. Si tratta di uno studio caso-controllo in cui è in corso di valutazione la distribuzione dei polimorfismi dei suddetti geni nella popolazione lucana. Tutti questi geni sono coinvolti nel metabolismo dei cancerogeni ed influenzano la suscettibilità individuale allo sviluppo di patologie neoplastiche.

Aggiornamento 2010

1) GSTM1 and NAT2 polymorphisms and colon, lung and bladder cancer risk: a case-control study

In questo lavoro sono stati valutati i risultati relativi all'analisi di GSTM1 e NAT2, i cui polimorfismi sono stati precedentemente associati al rischio individuale di sviluppare il cancro. Nell'ambito di uno studio caso-controllo, ad oggi, sono stati analizzati 92 pazienti affetti da tumore del colon, 75 del polmone 23 della vescica e 121 individui sani. Una analisi preliminare dei dati suggerisce che il gene GSTM1 possa avere un ruolo importante nello sviluppo del tumore del colon, soprattutto per il sesso femminile e nei casi di insorgenza al di sotto dei 65 anni di età, mentre potrebbe non avere un ruolo altrettanto importante per lo sviluppo di altri tipi di neoplasie, quali il tumore del polmone e della vescica, probabilmente più sensibili ai fattori ambientali o ad altri fattori genetici. Per quanto concerne l'altro gene studiato, NAT2, i nostri dati mostrano una maggiore espressione del fenotipo acetilatore lento tra i campioni oncologici nella loro totalità rispetto agli individui sani che, al contrario, esprimono maggiormente il fenotipo acetilatore rapido.

Il lavoro è stato pubblicato su *Anticancer Research*, (1F 1,414)

2) Polymorphisms of the Bcl2 gene in prostate cancer

Un secondo studio si propone di valutare le mutazioni delle regioni codificanti e non del gene Bcl2 (di 6 promotori P1, P2, P3, P4, P5, P6 e di 3 esoni ex2a, ex2b, ex2c, ex3) in pazienti affetti dal tumore della prostata. A questo studio hanno collaborato l'Università Cattolica di Roma, IAGROBIOS di Metaponto e IASL n. 4 di Matera. Sono stati ad oggi reclutati ed analizzati, con tecniche di PCR, elettroforesi e DHPLC, 65 pazienti con diagnosi di carcinoma della prostata, 29 pazienti

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

con diagnosi di ipertrofia prostatica benigna e non (istologia) e 94 controlli. I nostri risultati confermano in parte quanto già presente in letteratura, documentando, altresì, l'esistenza di una nuova mutazione nel promotore 4 indicata come 646 G>C in omozigosi.

Il lavoro è in stesura e sarà sottomesso su una rivista internazionale

3) Polymorphisms of DPYD and UGT1A1 genes in patients with colorectal cancer and correlation with toxicity to the drugs
Un terzo studio sui polimorfismi ha comportato la selezione di 70 pazienti con tumore del colon retto dalla banca di DNA presente nel laboratorio di Oncologia molecolare e di cui sono state raccolte informazioni dalle cartelle cliniche sulla risposta al trattamento ai chemioterapici (50 pts trattati con Irinotecano e 70 pts trattati con 5-FU) sia in termini di efficacia che di tossicità. Lo studio ha comportato l'amplificazione di 23 regioni codificanti e non del gene DPYD e dell'amplificazione della TATA box del gene UGT1A1. Si è proceduto poi, allo screening mutazionale dei campioni amplificati mediante la DHPLC e le mutazioni rilevate sono state identificate tramite sequenziamento in collaborazione con IAGROBIOS di Metaponto. Tutte le mutazioni riscontrate sono state confermate dai dati della letteratura; sono state inoltre riscontrate nuove mutazioni, come la sostituzione 141 G>A nella posizione 2 e la delezione 240-242 del GAA nella posizione 4. Sarebbe anche esistere una diretta correlazione tra mutazione e tossicità dovuta all'uso del 5-FU; infatti almeno il 60% dei pazienti che presentano mutazione hanno una tossicità a tale farmaco.

Il lavoro è in stesura e sarà sottomesso su una rivista internazionale

4) Development of specific siRNA for the treatment of prostate cancer

Una ulteriore linea di ricerca, condotta in collaborazione con l'Università Cattolica di Roma, ha comportato la messa in coltura di linee cellulari prostatiche androgeno-indipendenti (PC3), nelle quali abbiamo studiato l'espressione di siRNA per NF- κ B dopo trasfezione transiente in linee cellulari di prostata androgeno-indipendenti PC3. Le cellule PC3 sono state coltivate con metodo standard e trasfettate con il costrutto contenente il gene NF- κ B e con il costrutto di controllo mancante del c-DNA per NF- κ B (scramble o controllo sperimentale) necessario per distinguere il silenziamento sequenza-specifico dagli effetti sequenza-non specifica. È stata valutata l'efficienza di trasfezione (numero di cellule effettivamente trasfettate sul numero di cellule vitali), determinata dal gene reporter GFP (Green Fluorescence Protein), la cui concentrazione utilizzata (1 μ g) è stata sufficiente a garantire una buona efficienza di trasfezione. Abbiamo osservato che le PC3 aumentavano quando si utilizzava una concentrazione di siRNA di 1 μ g alle 48 ore dalla trasfezione rispetto al controllo e tale dato veniva confermato con il test di vitalità cellulare. Mediante Real-time PCR è stata effettuata la quantizzazione genica di NF- κ B ed è stata valutata l'espressione proteica mediante analisi immunocitochimica e di Western-blot. Abbiamo osservato, attraverso esperimenti di RT-PCR e confermati poi da Real-Time PCR, che la down-regolazione di NF- κ B determina un significativo silenziamento dei livelli di c-DNA in confronto alle cellule di controllo. Mediante analisi citofluorimetriche sono state inoltre valutate il ciclo cellulare delle PC3 e l'apoptosi; analizzando le variazioni nella progressione del ciclo cellulare al FACS, sono stati misurati la diminuzione della proliferazione, il blocco del ciclo cellulare in corrispondenza del checkpoint G0/G1-S, seguiti dal distacco delle cellule dal substrato e dall'induzione di apoptosi (morte cellulare programmata). Tutti questi esperimenti hanno dimostrato che la down-regolazione di NF- κ B tramite RNAi determina da una parte, un rallentamento della proliferazione di cellule tumorali prostatiche e le rende suscettibili all'apoptosi; dall'altra, determina una significativa riduzione dell'espressione proteica. Perciò si può ipotizzare che NF- κ B abbia un possibile ruolo pro-apoptotico e che sia un gene ad azione lenta con effetti antiproliferativi in grado di indurre apoptosi nelle cellule tumorali prostatiche. Inoltre, i nostri risultati suggeriscono che l'espressione del gene NF- κ B nelle cellule PC3 sia, almeno in parte, sotto il controllo di una regolazione tradizionale.

Il lavoro è in stesura e sarà sottomesso su una rivista internazionale

5) Polymorphisms of Cyp1A1, Cyp2E1, XRCC1 and cancer risk in the Basilicata population: a case control study

Un ultimo lavoro riguarda i polimorfismi genetici degli enzimi di fase I del metabolismo degli xenobiotici (Cyp 1A1, Cyp 2E1) e del gene di riparo XRCC1 in pazienti affetti da vari tipi di tumore afferenti all'IRCCS di Rionero in Vulture. Si tratta di uno studio caso-controllo in cui è in corso di valutazione la distribuzione dei polimorfismi dei suddetti geni nella popolazione lucana. Tutti questi geni sono coinvolti nel metabolismo dei cancerogeni ed influenzano la suscettibilità individuale allo sviluppo di patologie neoplastiche.

Il lavoro è stato sottomesso alla rivista Anticancer Research nel marzo 2011 (IF 1,414)

Attività previste Sulla stessa linea di ricerca rientra lo studio in corso dell'analisi dei geni di fase I Cyp 1A1 e Cyp 2E1 coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici e del gene di riparo del DNA XRCC1 (Arg194Trp e Arg399Gln).

L'obiettivo di questo studio è quello di valutare se il polimorfismo dei geni Cyp 1A1 e Cyp 2E1 possa essere associato, indipendentemente o insieme a fattori clinici e ambientali, ad una maggiore predisposizione al tumore e valutare se esiste una possibile relazione tra le varianti polimorfiche del gene di riparo XRCC1 (codone 194 e codone 399) e il rischio di manifestare

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

cancro.

Saranno selezionati circa 150 soggetti affetti da diversi tipi di tumore ricoverati presso IRCCS Centro di riferimento Oncologico della Basilicata e altrettanti soggetti sani rappresentanti la popolazione generale e considerati come controllo.

L'analisi dei polimorfismi dei geni CYP1A1 e CYP2E1 prevede due distinte metodiche di PCR, mentre l'analisi del gene di riparo XRCC1 (codone 194) dell'esone 6 e (codone 399) dell'esone 10 avviene mediante PCR multiplex.

Analisi preliminari dei polimorfismi dei geni Cyp 1A1 e Cyp 2E1 mostrano che la frequenza genotipica di Cyp è più elevata nei casi rispetto ai controlli e che il genotipo omozigote wild-type è più rappresentato rispetto agli eterozigoti sia nei casi che nei controlli.

Per quanto riguarda l'analisi dei polimorfismi del gene XRCC1 in base ai dati ottenuti finora relativi al codone 194 non abbiamo riscontrato nessun caso di omozigosi mutante, sia nei casi che nei controlli, il che esclude una correlazione tra polimorfismi XRCC1 Arg194Trp e aumentato rischio di cancro. Per quanto riguarda il codone 399 i dati sembrano mostrare una maggiore presenza dell'omozigote mutante (Gln/Gln) nei casi rispetto ai controlli potrebbe determinare una maggiore suscettibilità al rischio di cancro. Tuttavia sarà necessario stabilire ulteriori correlazioni per avere dati definitivi e valutare la suscettibilità al rischio di sviluppare il cancro.

In quest'ambito, sono stati avviati altri due studi riguardanti una analisi dei polimorfismi del gene Bcl2 e l'altra analisi dei polimorfismi dei geni UGT1A1 e DPYD nei pazienti affetti da carcinoma del colon-retto e correlazioni con la tossicità al farmaco. Il primo lavoro è rivolto alla valutazione del gene antiapoptotico Bcl2 implicato nella patogenesi dei tumori epiteliali, incluso il tumore della prostata. Dati di letteratura riportano che una over-espressione di tale gene potrebbe predisporre l'epitelio displastico alla instabilità genetica con conseguente sviluppo di neoplasia. Sono state valutate le mutazioni delle regioni codificanti e non del gene Bcl2 in pazienti affetti dal tumore della prostata. Inoltre sono state messe a punto tramite PCR le amplificazioni di promotori ed esoni; ad oggi, il numero totale è di 6 promotori (P1, P2, P3, P4, P5, P6) e 2 esoni (ex 2a, 2b, 2c, ex3). Lo studio è effettuato sul DNA estratto da sangue periferico di pazienti provenienti dall'Oncologia Medica dell'IRCCS CROB e di soggetti sani utilizzati come controlli; inoltre verrà utilizzato anche il DNA di pazienti con iperplasia prostatica e non, proveniente dall'Ospedale Madonna delle Grazie di Matera.

È previsto lo screening mutazionale dei promotori ed esoni amplificati mediante la dHPLC e le mutazioni rilevate sono state identificate tramite sequenziamento.

L'altro studio è volto ad individuare nuovi polimorfismi e la loro frequenza a livello dei geni DPYD e UGT1A1. Tale lavoro verrà effettuato su pazienti con tumore colon rettile che presentano tossicità ai chemioterapici e non. In particolare verranno analizzati i polimorfismi dei geni DPYD su pazienti trattati con 5-Fluoruracile e i polimorfismi del gene UGT1A1 su pazienti trattati con Irinotecano. Questa indagine ha lo scopo di associare un determinato polimorfismo genetico con lo sviluppo di tossicità al farmaco.

Dopo estrazione del DNA da tutti i campioni, verrà effettuata l'amplificazione dei frammenti del gene DPYD e della TATA box del gene UGT1A1. I prodotti di amplificazione di entrambi i geni saranno analizzati alla dHPLC e le mutazioni rilevate identificate tramite sequenziamento.

In entrambi gli studi sono state ad oggi già trovate ad oggi mutazioni non descritte in letteratura.

8 : Analisi proteomica nel mieloma multiplo ed altre neoplasie

Responsabile: Caivano Antonella

Programma:

Parole chiave: proteomica, mieloma MGUS, carcinoma polmonare, carcinoma mammario, metastasi cerebrali, angiogenesi

Altri enti coinvolti: Laboratorio Angiogenesi e patologia vascolare, DIMI, Università di Bari Istituto Superiore di Sanità Molecular and proteomics Medicine, George Mason University, Manassas, Virginia, USA

Anno inizio: 2009

Durata: 24

Tipologia: Preclinica

Area di interesse: Altro

Descrizione: Lo studio dei profili di espressione genica, nell'ultimo decennio sembrava rappresentare una svolta nella comprensione dei meccanismi patogenetici delle neoplasie ed una indagine chiave per la classificazione di pazienti anche in base alla risposta al

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

trattamento (farmacogenomica). Essa tuttavia presenta dei limiti in quanto le alterazioni dell'espressione di numerosi geni non sono necessariamente correlate alle alterazioni delle relative proteine.

L'analisi del corredo proteico cellulare ha, di recente, aperto nuove prospettive nel campo della diagnostica e nell'approfondimento delle conoscenze sui meccanismi patogenetici di varie patologie ed in particolare nelle neoplasie. Infatti, in molte neoplasie sono state evidenziate alterazioni qualitative e quantitative del contenuto proteico cellulare.

L'analisi proteomica si pone a completamento del profilo di espressione genica, poiché la regolazione della espressione proteica (a livello traduzionale e post-traduzionale) riflette l'importanza dei cambiamenti che avvengono a livello genico, quale adattamento alle funzioni cellulari.

La proteomica, lo studio del contenuto proteico di una cellula o tessuto e delle vie proteiche di trasduzione di segnali associate ad uno stato fisiologico o patologico, si propone di identificare, fra le centinaia di migliaia di proteine espresse in un tessuto, quelle che mostrano differenze significative di espressione in condizioni differenti o la cui espressione sia correlata con eventi cellulari specifici. Poiché le proteine sono coinvolte in quasi tutte le attività biologiche, il proteoma rappresenta una fonte fondamentale di informazioni per comprendere la biologia cellulare ed i suoi meccanismi.

Dalla conoscenza del quadro complessivo della espressione delle proteine in un tessuto e dalle modificazioni indotte da specifici stimoli possono derivare informazioni dirette, utili a tracciare una mappa delle funzioni cellulari. Ciò consente di approfondire la conoscenza dei pathways di trasduzione di segnali attivi nella cellula e nei tessuti, di comprendere come le alterazioni in una determinata catena proteica di trasduzione di segnali possano influenzare altre vie di signaling e come, nell'ambito della stessa catena di signaling le proteine interagiscono tra loro.

La conoscenza dettagliata di questa complessa rete di segnali intra- ed inter-cellulari potrebbe consentire al ricercatore biomedico di ottenere informazioni chiave sui meccanismi patogenetici di specifiche neoplasie. Tali conoscenze potrebbero rivelarsi utili nell'identificazione di bersagli terapeutici molecolari specifici, cioè di proteine chiave per le quali potrebbero essere disegnati farmaci selettivi, in grado di bloccare le vie di signaling patogenetiche.

Una delle sfide più interessanti dell'approccio proteomico è l'identificazione di marcatori biologici in grado di segnalare, il più precocemente possibile, l'alterazione della condizione normale della cellula.

Il presente progetto si propone di analizzare, utilizzando tecniche e strumenti di ultima generazione per l'analisi proteomica, alcuni processi che sono alla base della possibile patogenesi e progressione delle neoplasie umane, individuando nuovi marcatori biologici in grado di stratificare i pazienti con prognosi diversa e identificare possibili targets terapeutici.

Nello specifico questa ricerca si propone di studiare in modo approfondito mediante analisi proteomica:

- a) la progressione da Gammopatia Monoclonale di Significato Indeterminato (MGUS) a Mieloma Multiplo (MM), identificando biomarkers in cellule endoteliali di pazienti affetti da mieloma ed MGUS
- b) l'analisi del pathway di trasmissione del segnale del recettore del fattore di crescita epiteliale (EGFR) nel tumore polmonare primitivo non a piccole cellule;
- c) Studio del profilo molecolare delle metastasi cerebrali da tumore mammario e polmonare, con lo scopo di identificare trattamenti mirati per le metastasi mirati sul microambiente cerebrale.

a. Il progetto di ricerca è volto ad individuare differenze, sia quantitative che qualitative, dell'espressione proteica delle cellule endoteliali purificate dal midollo osseo di pazienti con MM (MMECs) in confronto a quelle purificate dal midollo osseo di pazienti con MGUS (MGECs), allo scopo di identificare nuovi targets molecolari utili per il trattamento.

Lo studio è condotto su pazienti affetti da MM, diagnosticati secondo i criteri dell'International Myeloma Working Group, e su soggetti affetti da MGUS, sottoposti ad ago aspirato midollare. Vengono studiati pazienti alla diagnosi, in recidiva, in fase plateau (remissione o malattia stabile).

Quale controllo vengono impiegate cellule endoteliali primarie umane della vena ombelicale (HUVEC), fornite dalla American Type Culture Collection, ATCC e cellule endoteliali isolate da soggetti anemici.

L'indagine prevede:

- Il processamento dell'ago-aspirato midollare dei pazienti, mediante gradiente di densità su Ficoll.
- Coltura delle cellule mononucleate ottenute in RPMI 1640 contenente FBS al 10% a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.
- Isolamento delle cellule endoteliali dalle cellule mononucleate, mediante selezione immunomagnetica con lectina (*Ulex Europaeus*), che lega le cellule endoteliali in maniera specifica.
- Coltura ed espansione delle cellule così selezionate in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), contenente siero fetale bovino (FBS) al 20%.
- Screening del profilo di espressione proteica su campioni di lisato cellulare totale di MMECs, di MGECs e di HUVECs mediante elettroforesi monodimensionale in condizioni denaturanti (SDS-PAGE). A tale fine, le proteine vengono estratte dalle cellule endoteliali seminate in petri da 100mm di diametro e raccolte quando raggiungono l'80% circa di confluenza. Le cellule

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

vengono quindi lisate in ghiaccio utilizzando un tampone di lisi costituito da RIPA buffer con l'aggiunta di inibitori delle proteasi. I lisati vengono centrifugati allo scopo di rimuovere la frazione insolubile del pellet, e viene raccolto il surnatante contenente la frazione proteica delle cellule. Il contenuto proteico presente nell'estratto viene quantificato mediante metodica Bradford. I campioni proteici (100µg), vengono quindi sottoposti ad una elettroforesi su gel di poliacrilamide al 10% di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) in condizioni denaturanti e riducenti.

- Rivelazione delle bande proteiche mediante colorazione del gel con Blu di Coomassie .
- Identificazione dei pattern proteici di interesse viene effettuata mediante analisi in spettrometria di massa micro-capillare (LC-MS/MS), in cui gli spots vengono eluiti dal gel e sottoposti a digestione triptica sino ad ottenere un certo numero di peptidi di cui viene determinata la massa esatta costruendo il profilo di massa della proteina. Tale profilo viene comparato, mediante peptide mass fingerprinted, con proteine clivate in vitro presenti in specifici database, al fine di identificare le proteine incognite.
- Validazione delle proteine così identificate mediante immunoblotting con specifici anticorpi ed immunocistochemica su biopsie midollari. A questo scopo, i campioni proteici (40µg), vengono sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilamide a gradiente 4-12% di sodio dodecil solfato in condizioni denaturanti e riducenti. Dopo la corsa, viene effettuato il trasferimento delle proteine dal gel su membrana di nitrocellulosa per tutta la notte. Ogni membrana viene successivamente posta in agitazione energica per il blocco dei siti aspecifici, e successivamente incubata per tutta la notte con gli anticorpi primari e quindi con il rispettivo anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi. La reazione viene rilevata mediante chemiluminescenza.
- Completamento del profilo di espressione proteica mediante elettroforesi bidimensionale (2DE-PAGE). La 2DE-PAGE (tecnica di elezione per lo studio del proteoma) consente di separare contemporaneamente centinaia di proteine, mediante due steps di elettroforesi: il primo in gradiente di pH (prima dimensione), il secondo mediante SDS-PAGE (seconda dimensione).
- Individuazione degli spots proteici mediante colorazione del gel con Silver Staining.
- Analisi delle immagini mediante software specifici.

b. Il secondo progetto riguarda la ricerca dell'espressione delle proteine coinvolte nelle vie di trasmissione cellulare, in particolare di quelle sotto il controllo del recettore dell'EGF, nel tumore primario del polmone.

Gli scopi principali del progetto sono:

1. Studiare quali proteine sono attivate nelle cellule tumorali per poter correlare la loro espressione con il processo di cancerogenesi del polmone e cercare così di individuare nuovi target terapeutici.
2. Comparare le vie di segnalazione cellulare in pazienti che, pur partendo dallo stesso grading tumorale, hanno mostrato outcome differenti, al fine di contribuire ad una migliore caratterizzazione molecolare del tumore.
3. Comparare i profili molecolari nel tumore primario del polmone con quello metastatico del tumore (met. Cerebrali) per valutare l'influenza del microambiente sull'attività della cellula tumorale.

Tale progetto prevede differenti fasi di lavoro; una prima fase di preparazione dei campioni, una fase di printing dei lisati proteici su particolari slides, una fase di immunostaining dei campioni printati, la scannerizzazione delle slides e l'analisi dei risultati con un programma specifico, MicroVigene.

c. La terza linea di questo progetto di ricerca si occupa dello studio del profilo molecolare delle lesioni metastatiche al cervello derivanti da tumore primario del polmone e della mammella.

Gli scopi di tale progetto sono:

1. Investigare quali sono le relazioni della teoria seed-soil di Paget delle metastasi da polmone e mammella nell'unico contesto del microambiente del cervello.
2. Identificare nuove molecole specifiche, coinvolte nel meccanismo delle metastasi al cervello, da usare come target bersaglio di nuovi farmaci.
3. Confrontare i pathway molecolari delle metastasi al cervello da polmone e mammella, valutandone le eventuali differenze, avvalendosi anche di altri profili molecolari relativi a metastasi al cervello da melanoma o da altri tipi di tumore primario.
4. Confrontare i profili molecolari delle metastasi al cervello da polmone e mammella con i relativi tumori primari, anche se non matchati, cioè appartenenti non agli stessi pazienti, e valutarne le eventuali differenze.
5. Confrontare i profili molecolari delle metastasi al cervello con i tumori primari al cervello (glioma e glioblastoma), e valutarne le eventuali differenze.

Risultati e prodotti conseguiti: Nel progetto il gruppo di ricerca di afferenza ha in precedenza dimostrato che senza una adeguata vascolarizzazione, il MM non è in grado di crescere e progredire. Le plasmacellule mielomatose e le cellule del microambiente midollare inducono e mantengono la formazione di nuovi vasi sanguigni, sia mediante angiogenesi (formazione di nuovi vasi a partire da vasi pre-esistenti) che vasculogenesi (formazione di nuovi vasi per differenziazione di progenitori indifferenziati). Infatti, sono stati dimostrati nel midollo osseo di pazienti con MM loop autocrini e paracrini di citochine angiogeniche (Fibroblast Growth

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Factor-2 - FGF2, Vascular Endothelial Growth Factor A - VEGF-A) in grado di promuovere e mantenere tali processi. La formazione di nuovi vasi nel midollo osseo di pazienti con MM è direttamente correlata alla progressione di malattia. L'angiogenesi richiede una attiva riprogrammazione delle cellule endoteliali mediante modulazione a livello trascrizionale e post-trascrizionale dell'espressione di varie proteine.

I dati ottenuti dallo screening iniziale dei contenuti proteici di MMECs ed MGECs mostrano pattern di espressione differenti. Le proteine caratterizzate fino a questo momento sono: annessina VI, filamina A, heat shock protein 90 (HSP90), proteina 14-3-3 zeta/delta, vimentina, α-enolasi, glucose regulated protein precursor.

Tutte queste proteine svolgono funzioni importanti nell'omeostasi e crescita cellulare, funzioni che risultano fondamentali nel processo angiogenico:

- attività metabolica (α-enolasi, glucose regulated protein precursor);
- riorganizzazione del citoscheletro e movimento cellulare (filamina A e vimentina);
- proliferazione cellulare e apoptosi (HSP90, proteina 14-3-3 zeta/delta).

Le proteine differenzialmente espresse nelle cellule endoteliali caratterizzate finora sono già note come biomarker plasmacellulari nei pazienti con MM14. Infatti, l'espressione di tali proteine nelle plasmacelle di pazienti con MM è stata messa in relazione con le fasi di progressione della malattia. Questi primi risultati sembrerebbero indicativi di un comportamento simil-tumorale delle cellule endoteliali di pazienti con MM, comportamento che ben correla con le alterazioni fenotipiche e genotipiche¹⁵ delle MMECs e che sembra giustificare la capacità di automantenere il processo angiogenico, confermando il ruolo di target delle cellule endoteliali per terapia a bersaglio molecolare.

b. Attualmente è terminata la fase di preparazione dei campioni durante la quale sono stati inclusi in OCT e tagliati al criostato 57 tessuti tumorali di polmone, di cui è stata valutata al microscopio la morfologia. Quelli ritenuti idonei (47 campioni) sono stati sottoposti a Microdissezione Laser al fine di separare le cellule tumorali da tutti gli elementi non tumorali presenti nel tessuto. È stata successivamente effettuata la lisi delle cellule, ottenute tramite microdissezione, per estrarne le proteine.

c. Al momento è stata ultimata la fase di allestimento e taglio al criostato con microdissezione di campioni bioptici di metastasi cerebrali pervenuti dallospedale INOVA di Fairfax (VA) e dall'Università di medicina VCU di Richmond (VA).

Aggiornamento 2010

Uno screening iniziale dei contenuti proteici delle MMECs e delle MGECs effettuato mediante SDS-PAGE, Western blot ed analisi al FACS, ha mostrato un pattern di espressione differente nei due tipi cellulari. Abbiamo identificato, in questo modo, le seguenti proteine come over-espresse nelle MMECs rispetto alle MGECs: filamina A, vimentina, proteina 14,3,3-zeta/delta, α-cristallin B. Tutte queste proteine svolgono funzioni importanti nell'omeostasi e crescita cellulare, funzioni che risultano fondamentali nel processo angiogenico. Mediante tecniche di immunocitochimica e successiva analisi al microscopio confocale abbiamo analizzato e definito la loro diversa localizzazione e distribuzione nelle MMECs ed MGECs. In questo periodo di attività di ricerca ho focalizzato l'attenzione sullo studio della funzione delle suddette proteine. A tale scopo è stata impiegata una strategia di silenziamento genico, mediante l'impiego della tecnica dell'RNA interference. Questa tecnica permette di abbattere l'mRNA e quindi l'espressione proteica in modo da valutare poi, l'impatto sulle funzioni cellulari coinvolte nell'angiogenesi.

Le proteine in esame sono state silenziate mediante l'utilizzo di un pool di quattro sequenze di siRNA in grado di legare in modo specifico il trascritto di ciascuna proteina determinandone la degradazione. Come controllo è stato utilizzato un pool di siRNA aspecifico (Control), che non interferisce con alcun trascritto all'interno della cellula e serve a valutare la specificità dei siRNA specifici. Le MMECs sono state trasfettate con la lipofectamina, un reagente di trasfezione di natura lipidica che facilita il passaggio del complesso RNA-lipofectamina all'interno della membrana cellulare.

L'efficienza di trasfezione della vimentina (VIM) dopo 72 ore, valutata mediante western blot, ha rivelato un abbattimento della proteina superiore all'85%. (Fig. 1A). La vitalità cellulare delle MMECs silenziate per VIM, e delle MMECs controllo e delle MMECs non trattate, è stata valutata mediante conta con Trypan Blue nella camera di Burkner. In seguito a silenziamento della VIM non si evidenzia un'incidenza sulla vitalità delle MMECs (Fig. 1B).

Per valutare il coinvolgimento della vimentina nella migrazione delle MMECs, è stato effettuato il test di chemiotassi. Le MMECs silenziate per vimentina, le MMECs trattate con siRNA aspecifico e le MMECs di controllo, sono state incubate in camera di Boyden e dopo 6 ore di incubazione è stata valutata la loro capacità di migrare attraverso i pori di una membrana ricoperta con fibronectina spinte dalla presenza di fattori chemioattraenti come il VEGF e IFGF-2. Il risultato ottenuto è un'incidenza nella migrazione delle MMECs silenziate per VIM pari al 60%. (Fig. 1C).

La capacità di spreading delle MMECs silenziate per vimentina, ovvero di emettere estroflessioni cellulari, quali lamellipodi

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

e filopodi, è stata valutata piastrando le cellule su piastre ricoperte con fibronectina per 90 minuti. Dopo fissazione e colorazione delle cellule con crystal violetto, è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595nm. Le MMECs silenziate per VIM mostrano una diminuzione del 50% della capacità di spreading rispetto alle MMECs controllo (Fig.1D).

Per valutare il coinvolgimento della VIM nella attività angiogenica delle MMECs, è stato effettuato un test di angiogenesi in vitro utilizzando il matrigel, composto ricco di proteine della matrice extracellulare e di fattori di crescita derivato dal sarcoma del topo Engelbreth-Holm-Swarm. A tale scopo, le MMECs controllo e le MMECs silenziate per VIM, sono state piastrate su matrigel ed incubate per 6 ore. Dopo le 6 ore, le MMECs controllo si estendono e si auto-organizzano a formare tubuli con giunzioni multicentriche che danno luogo a una rete di strutture simil capillari, mentre le MMECs silenziate per VIM non sono state in grado di protrudere le une verso le altre in modo efficace mostrando solo degli abbozzi di prolungamenti (Fig.1E). L'analisi di immagine (Fig.1F) conferma queste osservazioni, mostrando come nelle MMECs silenziate per vimentina diminuiscano significativamente sia i parametri topologici (lunghezza dei tubuli per campo) che l'estensione della rete cellulare (area percentuale ricoperta).

Per la proteina filamina A (FLNA) il picco massimo di silenziamento si osserva a 8 giorni dalla trasfezione, quando si raggiunge una riduzione del 80 % della sua espressione (Fig.2A). L'abbattimento di FLNA non si ripercuote sulla vitalità cellulare (Fig. 2B), mentre inibisce la capacità di spreading delle MMECs del 50% (Fig.2C) e la capacità migratoria del 40% (Fig.2D). In netto contrasto con la rete ben definita e strutturata formata dalle cellule trattate con siRNA aspecifico, le MMECs sottoposte a silenziamento genico per FLNA non riuscendo a dare origine ad estroflessioni e prolungamenti tipici dello spreading, non riescono a connettersi tra loro ma rimangono aggregate in piccoli gruppi (Fig.2E). L'analisi di immagine (Fig.2F) conferma queste osservazioni, mostrando come nelle MMECs silenziate per FLNA ci sia una marcata riduzione sia della lunghezza dei bracci, pari al 60%, che dell'area delle maglie, pari a circa l'80%.

In conclusione questi dati indicano che l'over espressione della VIM ed FLNA in MMECs può giocare un ruolo importante nell'induzione del fenotipo angiogenico. Di fatto, il loro abbattimento proteico è in grado di revertire l'attivazione e l'abilità delle MMECs di formare vasi, in vitro. Pertanto queste proteine potrebbero rappresentare dei possibili target per la terapia anti angiogenica nel trattamento del MM.

In laboratorio sono in itinere esperimenti con MMECs silenziate per Crystallin B ed la proteina 14-3-3 e 1562/1540.

Attività previste. Considerati i risultati preliminari ottenuti, si intende proseguire questo lavoro validando il profilo di espressione proteica sull'intero proteoma di MMECs e di MGECs, mediante elettroforesi bidimensionale. L'elettroforesi bidimensionale associata alla identificazione delle proteine in spettrometria di massa, rappresenta infatti la tecnica di elezione per lo studio del proteoma. I profili proteici ottenuti verranno analizzati mediante il software di analisi di immagine PDQuest (Bio-Rad), che ci consentirà di valutare tutte le differenze quantitative nella analisi comparata delle cellule endoteliali di pazienti con MM verso quelle isolate da pazienti con MGUS. Le proteine "segnale" identificate con un approccio proteomico potranno avere un ampio spettro di potenziali applicazioni. Potranno essere usate per lo sviluppo di nuove molecole antitumorali o per lo studio della funzione dei geni. Infine, questo studio si propone di indagare i pathways relativi a quelle proteine differenzialmente espresse in MMECs vs MGECs, più interessanti per la progressione tumorale, per mettere a punto sistemi di inibizione utili per lo studio di molecole potenzialmente applicabili nel trattamento del MM.

b. In programma il printing di tutti i campioni su vetrini di nitrocellulosa per allestire gli arrays proteici e quindi testare tutti i campioni con più di un centinaio di anticorpi diversi al fine di valutare i patterns di espressione proteica nei diversi pazienti. Alla fase del printing e dell'immunostaining seguirà la fase dell'analisi dei dati, utilizzando il programma MicroVigene che permetterà di confrontare e quantificare i profili molecolari tra i diversi campioni. Inoltre tramite Western Blot si cercherà di validare l'anticorpo di un nuovo oncogene implicato nel tumore del polmone, PKC α , che se validato, verrà utilizzato anch'esso per l'immunostaining al fine di valutarne l'espressione nei campioni.

c. Si sta per procedendo alla seconda fase di analisi degli endpoints proteici coinvolti nelle più importanti vie di segnalazione del segnale delle metastasi al cervello, mediante il printing e l'immunostaining dei campioni proteici precedentemente lisati in modo da estrarne le proteine. Inoltre, si cercherà di validare, mediante Western Blot, due nuovi anticorpi (mai utilizzati in tale laboratorio) diretti contro due nuovi trascritti proteici, AGTR1 e ST6GALNAC5, recentemente scoperti essere collegati al meccanismo di propagazione delle metastasi al cervello. Successivamente, se tali anticorpi verranno validati e se riconosceranno esclusivamente tali proteine, si procederà con lo studio degli stessi sui campioni di metastasi al cervello e si cercherà di studiarne il relativo coinvolgimento. In seguito, verrà eseguita l'analisi dei dati con MicroVigene program e la successiva analisi statistica.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

9 : Analisi genetico-molecolare nella patologia gestionale del trofoblasto

Responsabile: SANSEVERINO FRANCESCA

Programma:

Parole chiave: TIMP, Mola, Trofoblasto, Ciclocellulare, Matrice Extracellulare, Metallo-proteinasi, Angiogenesi, Corioncarcinoma

Altri enti coinvolti: Marshall University - One John Marshall Drive - Huntington, WV 25755, U.S.A.

Anno inizio: 2009

Durata: 24

Tipologia: Clinico-Epidemiologica sperimentale

Area di interesse: Altro

Descrizione: Il cancro è un disordine che colpisce quelle attività cellulari che sono essenziali per lo sviluppo e l'omeostasi dell'organismo, come la crescita, la differenziazione, l'integrità dei tessuti e l'apoptosi. La perdita di controllo della crescita porta all'accumulo di cellule, producendo un tumore. La perdita dell'integrità del tessuto e la sopravvivenza ectopica segnano la differenza fra i tumori benigni non invasivi e quelli maligni invasivi. L'invasione è caratterizzata dalla presenza di cellule in tessuti differenti dai loro tessuti di origine e questo implica la penetrazione delle cellule nello stroma attraverso il superamento della barriera della membrana basale. La metastasi è caratterizzata dalla crescita di cellule in organi distanti dall'organo di origine (sito secondario). Per formare metastasi le cellule neoplastiche hanno bisogno di essere trasportate dalla circolazione linfatica, sanguigna o attraverso le cavità corporee. In maniera simile, le cellule trofoblastiche penetrano nei vasi della circolazione sanguigna e, fuoriuscendo da essi, invadono il tessuto uterino. Per questa ragione, nella ricerca di molecole espresse nei tumori la placenta rappresenta, indubbiamente, un modello di particolare interesse. Le molecole trofoblastiche, implicate in questo controllo, sono potenziali candidati come soppressori tumorali ed è possibile ipotizzare che siano assenti o modificate nelle cellule tumorali. È interessante quindi capire come le molecole coinvolte nello sviluppo fisiologico dalla placenta possano alterarsi nelle cellule trofoblastiche neoplastiche (mola idatiforme, mola invasiva e corioncarcinoma). La mola e il corioncarcinoma sono alterazioni del trofoblasto. Entrambi riflettono differenti fasi di un continuo spettro di alterazioni degli stessi processi. Il normale sviluppo della placenta e le alterazioni neoplastiche come la mola idatiforme (cellule trofoblastiche altamente proliferative), la mola invasiva e il corioncarcinoma (cellule trofoblastiche altamente invasive) rappresentano un modello per studiare i processi di proliferazione, di migrazione e invasione cellulare. Nelle malattie gestazionali trofoblastiche (GTD), il rischio è caratterizzato da una anormale capacità proliferativa, i meccanismi di controllo sono alterati determinando un'anormale proliferazione del trofoblasto, invasione del miometrio locale ed metastasi a distanza. Il processo dell'invasione del trofoblasto coinvolge la degradazione enzimatica della matrice extracellulare (ECM) e gli inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMP) con alterazioni di oncosoppressori hanno un ruolo critico nello sviluppo del tumore. L'omeostasi della ECM è controllata da un delicato equilibrio tra la sintesi delle proteine, la produzione di proteasi degradanti e la presenza di inibitori della proteasi. Tra queste proteasi abbiamo le metalloproteinasi della matrice (MMP), una famiglia di zinco-endopeptidasi che degradano proteoliticamente tutti i componenti della matrice extracellulare. La down-regulation di MMP può verificarsi a livello trascrizionale dei geni con attivazione di proenzimi e interazione con quattro omologhi TIMP. Gli inibitori tissutali delle MMP comprendono una famiglia di quattro membri di inibitori omologhi (TIMP1, 2, 3, and 4). Le TIMPs hanno dimostrato di avere attività promotrici della crescita che sono indipendenti dalla loro capacità inibitoria delle MMP e proprietà induttrici dell'apoptosi (TIMP3). In questo studio vogliamo valutare l'espressione delle TIMPs coinvolte nell'omeostasi della ECM e di diverse proteine, essenziali per il controllo del ciclo cellulare (p53, p16INK4A, p27KIP1, p21WAF1, e pRb2/p130), lo sviluppo e la differenziazione dei tessuti (EZH2), l'angiogenesi (VEGF) e la proliferazione cellulare Ki 67 in placente al primo trimestre e nella mola idatiforme, al fine di chiarire i meccanismi molecolari coinvolti nei processi di trasformazione e progressione maligna. P53, p16INK4A, p27KIP1, p21WAF1, RB2/p130 sono oncosoppressori che modulano la proliferazione cellulare attraverso il controllo della fase G1 del ciclo cellulare. VEGF è una glicoproteina omodimerica che funziona come un fattore mitogeno per le cellule endoteliali. Secreto da molti tipi di cellule, la sua espressione è up-regolata da ipossia. Dati sperimentali suggeriscono un maggior coinvolgimento di questa proteina nell'angiogenesi tumorale, processo di primaria importanza per la progressione neoplastica e la diffusione metastatica. Recentemente, l'espressione di VEGF ha dimostrato di essere down-regolata, a livello trascrizionale e traslazionale, da Rb2/p130. Inoltre, Rb2/p130 interagisce con EZH2 e il ruolo funzionale di questa proteina-

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

proteina è quello di interferire con l'attività repressiva di pRb2/p130 sul ciclo. Il Ki-67 è un anticorpo monoclonale che reagisce con un antigene nucleare espresso nelle cellule proliferanti. L'espressione di questo antigene si attua di preferenza durante la fase tarda G1, S, G2, mentre nelle cellule in fase G0 l'antigene non può essere rilevato. Di conseguenza, l'anticorpo è utilizzato nella patologia tumorale per determinare l'indice proliferativo.

Risultati e prodotti conseguiti: Lo studio presente ha indagato l'espressione proteica e di mRNA di TIMP1-2-3 e TIMP-4, pRb2/p130, VEGF, EZH2, p53, p16 (INK4A), p27 (Kip1), p21 (WAF1) e Ki-67 nella mola idatiforme e nelle placenti, nel primo trimestre di gravidanza, mediante immunohistochimica, WB e Quantitative Real-Time RT-PCR. Dati preliminari hanno evidenziato che entrambe, placenta al primo trimestre e mola idatiforme, hanno espresso TIMP1-2-3 e TIMP-4 sia a livello trascrizionale che a livello traduzionale. Il livello di espressione di TIMP-1 si è evidenziato essere significativamente più alto nella mola idatiforme che nel citotrofoblasto umano, mentre i livelli di espressione di TIMP-2,3,4 erano molto più bassi nella mola idatiforme che in cellule umane del trofoblasto. Per la prima volta questo studio ha dimostrato aumentati livelli di TIMP-1 e ridotti livelli di TIMP-2,3,4 sia ai livelli della proteina che del mRNA nei tessuti di mola idatiforme. L'espressione aumentata di TIMP 1 e quella diminuita di TIMP2, 3 e 4 nella mola idatiforme sono state confermate sia dalla Quantitative Real-Time RT-PCR che dal WB. Più significativamente, l'up e down-regolazione nella mola idatiforme è stata, inoltre, dimostrata dallo staining immunohistochimico. L'espressione differente di TIMP-1-2-3 e TIMP-4 nei tessuti maligni suggerisce come le TIMPs contribuiscano in maniera differente all'abilità invasiva delle GTD. In aggiunta, nella mole idatiforme, si è evidenziato come EZH2 corredi con alti livelli di p53, Ki-67, e pRb2/p130 citoplasmatica ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, rispettivamente). Aumentata espressione di EZH2 è stata trovata nel corioncarinoma, correlando con il rischio di metastasi a distanza, a dimostrazione che questa proteina può avere un valore prognostico in questo tipo di cancro. È interessante notare che una forte correlazione inversa è stata osservata tra p27 (Kip1), i livelli di espressione, il rischio di malattia in stadio avanzato e metastasi; una correlazione positiva tra i livelli di espressione di p21 (WAF1) e placenta ha confermato il ruolo tradizionalmente accettato per questi geni di soppressori tumorali. Infine, una correlazione diretta statisticamente significativa è stata trovata tra i livelli di espressione di pRb2/p130 nucleari e placenta. Nell'insieme, questi dati, attualmente sottomessi a due diverse riviste, possono aiutare a gettare una luce supplementare sui meccanismi patogenetici legati alla trasformazione cellulare.

In questo studio, l'esposizione di cellule di adenocarcinoma endometriale HEC-I-B alla Metformina ha causato l'arresto delle cellule in fase G1, e, successivamente, ha indotto apoptosi. Inoltre, la metformina ha aumentato i livelli di proteine p27KIP1 e retinoblastoma-Rb2/p130, p21 mentre è inalterata l'espressione di bax, PARP e bcl2 (fig.1). Inoltre in vitro abbiamo dimostrato che l'utilizzo della metformina dose-dipendente porta a ridurre in maniera significativa la proliferazione cellulare. Questi eventi sono stati accompagnati da un marcato aumento di espressione del recettore alfa per gli estrogeni e del recettore del substrato dell'insulina (IRS-I).

I nostri risultati dimostrano per la prima volta che la ri-espressione del ER e del IRS-I (fig.2), così come up-regulation di p27KIP1 e pRb2/p130, potrebbero rappresentare i bersagli della metformina nella regolazione del ciclo cellulare di cellule di adenocarcinoma così trattate. Si potrebbe ipotizzare che la riespressione del recettore per gli estrogeni rappresenterebbe il risultato di un reindirizzamento della cellula maligna da uno stato di indifferenziazione ad uno più differenziato e quindi potenzialmente meno aggressivo.

AGGIORNAMENTO 2010

Non sono disponibili dati specifici aggiuntivi.

I risultati ottenuti sono in corso di elaborazione per la pubblicazione.

Attività previste Analisi dei livelli di espressione del mRNA e della proteina di TIMPs e di pRb2/p130, VEGF, EZH2, p53, p16 (INK4A), p27 (Kip1), p21 (WAF1), Ki-67, e le loro possibili correlazioni con fattori clinico patologici. Tessuti congelati e paraffinati saranno utilizzati per questo compito. Tessuti congelati saranno raccolti da 40 pazienti GTD e da 40 placenti normali. Per gli studi su tessuti inclusi in paraffina, 80 campioni provenienti da pazienti GTD e 80 normali placenta saranno utilizzati. La valutazione istologica di tutti i casi sarà eseguita di routine su sezioni colorate con ematossilina e eosina; la diagnosi sarà resa dai patologi utilizzando criteri standard. L'espressione dei membri della famiglia TIMP sarà misurata da WB, immunohistochimica e Real-time quantitative RT-PCR. Identificazione e la valutazione di nuove mutazioni nella regione promotore di tutti i geni umani TIMP. L'obiettivo è quello di individuare mutazioni sconosciute nel promotore e codificare le regioni dei geni TIMP e di valutare i loro effetti in diversi sistemi "in vitro". Wild-type/mutant cDNA e regioni promotore wild-type/mutant di tutti i geni TIMP saranno clonati in vettori luciferasi PGL3. L'effetto delle mutazioni sulla sequenza promotore di geni TIMP sarà valutata mediante saggio luciferasi. TIMP full-length e costrutti mutanti saranno sub-clonati. Un mutante cDNA TIMP da pazienti GTD e corrispondenti wild-type sarà clonato ed

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

espresso in un sistema in vitro.

Il DNA genomico sarà estratto utilizzando il QIAamp Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germania).

Al fine di effettuare l'analisi mutazionale, saranno codificate tutte le regioni, compresi i siti di splicing di accompagnamento. I parametri delle reazioni di amplificazione saranno ottimizzati per ogni frammento. Volumi uguali di reazione a catena della polimerasi (PCR), prodotto da ciascun paziente e da una wild-type di controllo saranno miscelati per ottenere eteroduplex. Lo screening mutazionale, effettuato su tutti i frammenti amplificati da ogni paziente, sarà condotto tramite DHPLC Helix sistema di Varian, Varian Analytical Instruments, CA, USA. Campioni che presentano un picco anomalo saranno sequenziati utilizzando una fluorescente ABI Prism kit BigDye (Applied Biosystems, UK), e le mutazioni saranno caratterizzate. Ogni mutazione sarà confermata amplificando il campione mediante PCR. Tutte le mutazioni trovate saranno verificate dal sequenziamento automatizzato.

Il prossimo obiettivo dello studio si prefigge di arruolare 100 donne sane, non affette da patologie oncologiche e cardiovascolari, e 100 donne in terapia con tamoxifene per patologia pregressa mammaria, per verificare l'efficacia preventiva della metformina, assieme ad una corretta alimentazione, nel contrasto del cancro allendometrio e di malattie cardiache. Sappiamo che le donne che hanno nel sangue più alti livelli di insulina e di ormoni sessuali si ammalano di più. Anche le donne obese o in sovrappeso si ammalano di più (dopo la menopausa), così come le donne diabetiche o con squilibri metabolici come glicemia alta, trigliceridi alti, pressione alta, e bassi livelli di colesterolo buono, condizioni che definiscono la cosiddetta sindrome metabolica. Migliorare l'alimentazione ed aumentare l'attività fisica migliorano queste condizioni, ma ci sono sempre più indizi che la metformina, possa ridurre il rischio di ammalarsi di cancro dell'endometrio.

Il primo obiettivo del progetto è di studiare l'effetto della metformina, somministrata per 5 anni, sull'insorgenza dei tumori all'endometrio in donne sane ed in pazienti in terapia con tamoxifene per patologia pregressa mammaria. Lo studio sarà condotto con la collaborazione di donne a più elevato rischio tumore per età (dovranno essere in menopausa, tra i 50 e i 74 anni) e presenza di componenti di sindrome metabolica, una condizione predisponente al diabete di tipo 2. Dovranno prendere quotidianamente due pillole, che per metà delle partecipanti, scelte in modo rigorosamente casuale, conterranno metformina, e per metà saranno senza farmaco (placebo).

Il secondo obiettivo dello studio è di valutare l'effetto della metformina sulla insorgenza di malattie cardiovascolari nelle donne, includendo in questa definizione malattie cardiache e ictus cerebrale. Poiché la patologia cardiovascolare rappresenta la causa principale di morte nelle donne e poiché sia il tumore all'endometrio e sia le malattie cardiovascolari condividono nel diabete di tipo 2 un fattore di rischio importante, lo studio proposto include le malattie cardiovascolari come secondo obiettivo di prevenzione. In questo caso, l'ipotesi di studio è che le donne a cui sarà somministrata metformina osserveranno una minore frequenza di malattie cardiovascolari rispetto alle donne che faranno uso del placebo durante i cinque anni di conduzione dello studio. Una volta all'anno le donne saranno sorvegliate con visita cardiologica, ECG ed ecocardiografia, visita ginecologica, Paptest ed ecografia TV, eventualmente isteroscopia con biopsia dell'endometrio se clinicamente indicato.

Lo studio sarà in cieco cioè le partecipanti e gli operatori non saranno a conoscenza di chi sta prendendo il farmaco e chi il placebo, ma l'informazione sarà sempre disponibile al medico curante che ritenesse di farne richiesta.

A tutte le partecipanti verranno anche date raccomandazioni alimentari, e un sottogruppo verrà anche aiutato a cambiare dieta partecipando a corsi di cucina. Complessivamente lo studio richiederà la collaborazione di 100 donne sane, non affette cioè da patologia oncologica e cardiovascolare e 100 donne in terapia con tamoxifene per patologia pregressa mammaria.

Linea di ricerca n. 2 : La Valutazione dello Stato di Salute: dal Fattore di Rischio alla Qualità delle Cure

2 : Prevenzione delle recidive di cancro della mammella mediante la dieta e l'attività fisica

Responsabile: Galasso Rocco

Programma:

Parole chiave: Cancro della mammella, dieta, attività fisica

Altri enti coinvolti: CPO Piemonte Centro per l'Epidemiologia e la Prevenzione Oncologica Torino Department of Food Safety and Veterinary Public Health ISS Roma Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale Università Federico II - Napoli Experimental Oncology, Department of Oncology - ARNAS-Civico - Palermo Local Health Authority of Milan Molecular and Nutritional Epidemiology Unit - CSPO, Florence

Anno inizio: 2007

Durata: 36

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Terapeutica

Descrizione: Studi epidemiologici osservazionali hanno evidenziato che fattori quali sedentarietà, sovrappeso (dopo la menopausa), elevati livelli sierici di androgeni, estrogeni, insulina, IGF-I e la presenza dei marcatori della sindrome metabolica sono associati con un aumentato rischio per cancro della mammella e con una prognosi peggiore. Trial randomizzati di intervento hanno mostrato che alcuni fattori ormonali e metabolici possono essere favorevolmente modificati aumentando l'attività fisica, perdendo grasso corporeo e adottando abitudini alimentari che diminuiscono l'insulina circolante quali la dieta mediterranea o quella macrobiotica. Due trial randomizzati sulla riduzione dell'assunzione dei grassi totali, condotti negli USA, hanno mostrato che questa sola variazione nella dieta riduce l'incidenza del cancro della mammella del 9% (WHI study) e la ripresa di malattia del 24% (WINS study). Nello studio WHI l'effetto era maggiore (14-25%) nelle donne che presentano i marcatori della sindrome metabolica quali ipertensione, diabete, elevata circonferenza addominale o leucocitosi. Nello studio WINS l'effetto era più marcato nei pazienti con tumori ER- (42%), probabilmente perché i tumori ER+ venivano trattati con il tamoxifene cui si può attribuire un beneficio maggiore di quello ottenibile con la sola dieta. Il progetto vuole valutare se un intervento combinato su più fattori di rischio modificabili quali l'attività fisica, la riduzione del peso corporeo (se necessario), una dieta salutare possa ottenere un effetto preventivo maggiore rispetto alla modifica di un singolo fattore. L'ipotesi in studio è che un intervento su abitudini di vita mediante aumento dell'attività fisica, la riduzione del peso corporeo, la diminuzione del consumo di cibi contenenti grassi saturi e con elevato indice glicemico, con un aumento del consumo di alimenti a base di piante con una varietà di ortaggi, legumi ed alimenti amidacei poco raffinati o trasformati a basso indice glicemico possa ridurre la recidiva del cancro della mammella del 30% o più. Il progetto fa seguito ai precedenti trial controllati randomizzati (DIANA dieta ed androgeni - 1 e 2) che hanno mostrato che una modificazione delle abitudini alimentari in postmenopausa può favorevolmente modificare i pattern ormonali e metabolici che gli studi prospettici di coorte hanno consistentemente trovati associati con un aumentato rischio di sviluppare un cancro della mammella. L'obiettivo principale è quello di testare la possibilità di effettuare uno studio di intervento su larga scala in Italia e valutare se un miglioramento sostenibile delle abitudini alimentari e dell'attività fisica può favorevolmente modificare i principali marcatori metabolici ed ormonali (testosterone sierico, estradiolo, insulina, SHBG, IGF-I, IGF-BP 1 & 2, glucosio, trigliceridi e HDL) correlati con un aumento del rischio di sviluppare cancro della mammella. L'obiettivo finale è quello di testare se un intervento sulle abitudini di vita diretto alla promozione di una moderata attività fisica, alla riduzione o al controllo del peso corporeo insieme ad una dieta più salutare possa determinare una riduzione del rischio di sviluppare recidiva di cancro della mammella in donne con diverso rischio metabolico, ormonale e neoplastico. Il coinvolgimento di U.O. del meridione di Italia (Napoli, Rionero in Vulture e Palermo) propone ulteriori obiettivi specifici quali l'attuazione di un trial di intervento con elevato potenziale preventivo in luoghi dove tali attività sono state spesso neglette e la possibilità di fornire un importante pezzo di evidenza scientifica in quanto la popolazione reclutata nel Sud Italia può comportarsi in maniera completamente differente riguardo alle indicazioni per la prevenzione mediante modifiche delle abitudini alimentari e dell'attività fisica. La possibilità di utilizzare i sistemi informativi amministrativi basati sulle SDO e i registri di mortalità nazionali rendono fattibile relativamente semplice attivare il follow up.

Risultati e prodotti conseguiti: Organizzazione operativa per la partecipazione al Progetto DIANA5 e il completamento delle procedure amministrative. Presa d'atto e Firma del protocollo d'intesa.

Richiesta del parere del Comitato Etico dell'Ospedale alla conduzione dello studio e presentazione della documentazione, dei questionari, della modulistica, dei consensi informati.

Sensibilizzazione dei GIC (Gruppi Interdisciplinari di Cura) della Rete Oncologica Regionale sugli obiettivi scientifici dello studio DIANA5;

Redazione di materiale informativo per associazioni di malati e di professionisti coinvolti nella cura del tumore al seno; Avvio della campagna di reclutamento.

AGGIORNAMENTO 2009

E' proseguita l'attività di reclutamento delle partecipanti con l'inserimento di 9 donne nel gruppo verde (controllo) che riceveranno esclusivamente raccomandazioni generali per uno stile di vita sano senza, tuttavia, avere nessun supporto attivo; 8 in quello blu (intervento): riceveranno informazioni individuali sullo stile di vita, frequenteranno corsi di cucina e di ginnastica, faranno pasti comuni e riunioni di rinforzo, con l'aspettativa che questo porti ad un cambiamento completo di stile di vita e alimentazione; 3 nell'arancione: gruppo delle donne non eleggibili in quanto operate al seno negli ultimi 5 anni di età compresa tra i 35 ed i 70 anni con diagnosi di carcinoma infiltrante ma senza i criteri di alto rischio, per il quale si farà solo il follow-up e riceveranno comunque le raccomandazioni del gruppo verde

Aggiornamento 2010.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

A gennaio, le attività dell'U.O. sono proseguite con il reclutamento che è stato condotto con modalità proattiva. In pratica sono state prese in considerazione tutte le donne operate al seno delle quali era presente in ospedale documentazione clinica. Le donne risultate eleggibili sono quindi state contattate telefonicamente o nel corso di un successivo accesso in ospedale per visita o indagini strumentali. È stato loro illustrato il progetto: finalità e modalità di partecipazione. Tutte le donne che non hanno dato immediatamente la loro disponibilità a partecipare sono state ricontattate telefonicamente salvo esplicito diniego. Di 978 donne con documentazione clinica presente in ospedale sono risultate eleggibili 388 e solo 79 hanno dato la propria disponibilità a partecipare al progetto (32 Blu, 31 Verde e 16 Arancione); 41 donne risiedono in provincia di Potenza, 16 in provincia di Matera e 22 provengono dalle regioni limitrofe (Puglia, Campania, Calabria). La posizione geografica dell'Ospedale che raccoglie casi da un ampio bacino di utenza ha condizionato la partecipazione al progetto e la distribuzione delle residenze delle partecipanti in una vasta area geografica condiziona gli accessi in ospedale e diminuisce la partecipazione delle donne agli incontri programmati. In considerazione di quanto sopra evidenziato le previste attività relative ai corsi di cucina sono state programmate con cadenza mensile invitando a parteciparvi sempre tutte le donne del gruppo di intervento; si è scelto di utilizzare un giorno della settimana diverso per ogni incontro ed orari pomeridiani in modo da favorire le donne con attività lavorativa nel mattino e/o con rientri pomeridiani. Gli argomenti degli incontri sono solo in parte definiti e possono essere ripetuti secondo necessità e richieste. Ampio spazio viene lasciato alla discussione delle esperienze personali nella partecipazione al progetto, vi sono scambi di ricette e suggerimenti sul reperimento di materie prime di qualità. La discussione viene sempre guidata ed indirizzata verso gli obiettivi del progetto. Le difficoltà logistiche (già manifestate nella precedente relazione 2 anno) legate alla assenza della cucina e di una sala mensa per i dipendenti (i cui lavori sono ancora in corso) hanno reso necessaria la registrazione preventiva delle preparazioni delle ricette su un supporto multimediale che viene utilizzato negli incontri. Al termine viene proposta una piccola colazione di lavoro con le pietanze dolci e salate precedentemente preparate ed oggetto della presentazione e viene distribuito un piccolo ricettario. In considerazione del tasso di partecipazione agli incontri è stato predisposto un programma di telefonate periodiche tese solamente alla valutazione del grado di aderenza alle prescrizioni del progetto. Relativamente all'attività fisica, considerate le distanze che separano le partecipanti vengono organizzati periodici incontri dimostrativi presso una scuola di ballo ed una palestra.

Attività previste Disegno dello studio: randomized controlled study con due bracci Popolazione: donne operate negli ultimi tre anni. Tutti i casi ER negativi saranno eleggibili anche senza indicatori endocrino-metabolici di alto rischio mentre saranno eleggibili tutte le pazienti con Sindrome metabolica e/o testosterone > 0.4 ng/mL o livelli di insulina > 50 pmol/L. Per la definizione di sindrome metabolica si farà riferimento ai criteri della International Diabetes Federation, in cui la soglia della glicemia è 100 mg/100 mL anziché 110. Le altre soglie sono trigliceridi > 150 mg/dL, HDL < 50 mg/dL, pressione arteriosa sistolica > 130 mmHg, diastolica > 85 mmHg, o terapie in atto per alterazioni di questi parametri. Eventuali pazienti diabetiche non saranno escluse. Il testosterone è scelto come principale indicatore ormonale perché predittivo per il cancro della mammella, perché la sua determinazione è più semplice che quella di altri ormoni e perché i suoi valori sono influenzati dall'attività fisica e dai cambi nella dieta. La randomizzazione sarà stratificata per centro di reclutamento, ER positivi o negativi, N+ o N-, età (<= 50 anni, >50 anni). Nel caso le pazienti siano inserite in altri trial adiuvanti, se i clinici lo richiedono, si stratificherà prioritariamente per braccio di randomizzazione. Il testosterone sierico ed i livelli plasmatici di glucosio, trigliceridi e colesterolo saranno misurati in tutte le donne al momento dell'arruolamento e dopo un anno per valutare la compliance. Il centro di Rionero in Vulture recluterà circa 100 donne. L'intervento consiste nell'aumentare l'attività fisica, controllare il peso e promuovere abitudini alimentari più salutari. attività fisica: l'obiettivo è raggiungere e mantenere una regolare attività fisica di moderata intensità (circa 35 METS) per 210 minuti per almeno 3 giorni a settimana (30 minuti medi al giorno), diminuire i comportamenti sedentari per 30 minuti al giorno per almeno 5 giorni alla settimana. Le donne che vorranno effettuare attività fisica più intensa verranno incoraggiate a farlo mentre tutte le altre dovranno mantenere attività più moderata quale ad esempio camminare. Il monitoraggio avverrà mediante questionario auto valutativo. controllo del peso: ridurre l'introito di energia in relazione ai consumi è il principale scopo della dieta per promuovere una perdita di peso nelle partecipanti obese o sovrappeso, mentre nella partecipanti normopeso è quello di mantenere un bilancio energetico bilanciato. La densità energetica degli alimenti è una delle caratteristiche di una dieta che può essere facilmente manipolata per mantenere il volume e senso di sazietà diminuendo l'introito energetico. Le partecipanti saranno incoraggiate ad includere nella loro alimentazione grani interi e verdura ad elevato contenuto di fibra, che aggiungono volume ai pasti, a scegliere cereali cotti piuttosto che pane secco o cracker, a mangiare insalata di verdure, zuppa di verdure prima di mangiare cibi ad elevato contenuto di energia, a scegliere frutta fresca, piuttosto che succhi di frutta, e a pianificare i pasti al fine di limitare la possibilità di lottare con il cibo e ridurre l'iperalimentazione piuttosto che il numero dei pasti stessi. Dieta: per diminuire la risposta glicemica e insulinica le raccomandazioni includeranno: la riduzione dell'assunzione di calorie, attraverso il consumo di alimenti altamente sazianti, come ad esempio cereali integrali, legumi e verdure la riduzione degli alimenti ad elevato indice glicemico, come ad esempio farine raffinate, patate, riso bianco, corn flakes, e gli alimenti ad alto indice insulinemico come ad esempio lo zucchero e il latte,

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

preferendo invece riso non brillato, orzo, miglio, avena, farro, grano saraceno e quinoa, legumi (qualsiasi tipo compresi i prodotti di soia), ortaggi (qualsiasi tipo, tranne le patate) La riduzione delle fonti di grassi saturi (carni rosse e trasformate, latte e prodotti lattiero-caseari) preferendo grassi vegetali, come ad esempio l'olio d'oliva, noci e semi oleaginosi. La riduzione dell'assunzione di proteine, principalmente proteine animali (ad eccezione del pesce) Il gruppo di controllo riceverà le raccomandazioni generali per abitudini di vita salutari senza alcun supporto attivo Il gruppo di intervento avrà una combinazione di contatti singoli e di gruppo nel corso di un anno. Singoli contatti saranno svolti da consulenti sugli stili di vita formati centralmente su nutrizione, esercizio fisico e modifiche dei comportamenti. Sessioni di gruppo mensili comprenderanno lezioni e discussioni su alcuni temi, classi di cucina, pasti in comune.

3 : Cardiotoxicità delle terapie oncologiche

Responsabile: Gallucci Giuseppina

Programma:

Parole chiave: Cardiotoxicità, Tumori, Chemioterapia antilinfomica

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2009

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Altro

Descrizione: La cardiotoxicità cronica da somministrazione di antracicline è diffusamente descritta in letteratura. Dalla loro introduzione in terapia negli anni 60 la doxorubicina e l'epirubicina sono state considerate gli agenti più efficaci nella terapia del tumore della mammella e sono presenti in molti protocolli adiuvanti e palliativi. Il loro uso è limitato dal danno miocardico dose-dipendente che può portare ad insufficienza cardiaca con ridotta qualità di vita e morte per scompenso cardiaco refrattario. Altri farmaci utilizzati per il tumore mammario hanno importanti effetti collaterali sul sistema cardiovascolare, tra questi i taxani, gli agenti alchilanti (cisplatino) ed il mitoxantrone. Anche le nuove targeted therapies come il trastuzumab, il bavacizumab e gli inibitori della tirosin chinasi (sunitinib) possono determinare una compromissione della funzione ventricolare sinistra con meccanismi non ancora chiariti, ma diversi da quelli ipotizzati per le antracicline. La disfunzione cardiaca irreversibile legata alla terapia con antracicline viene definita di tipo I (type I Chemotherapy Related Cardiac Dysfunction), mentre quella da trastuzumab non dose-dipendente, non associata ad alterazioni ultrastrutturali, determinata da una disregolazione del pathway di sopravvivenza cellulare HER2/HER 4 e potenzialmente reversibile viene definita di tipo II. Recentemente sono emerse anche problematiche riguardanti un aumentato rischio cardiovascolare determinato dall'uso degli inibitori dell'aromatasi, soprattutto quando confrontati con l'effetto protettivo del tamoxifene sull'assetto lipidico e, quindi, sul rischio cardiovascolare. E un interplay non ancora chiarito quello tra le varie terapie del cancro della mammella (antracicline, trastuzumab, radioterapia toracica, terapia ormonale) da una parte, e tra gli agenti cardi tossici ed i fattori di rischio della donna in post menopausa dall'altra. Un lavoro di Jones pubblicato sul JACC del 2008 fa rilevare come il miglioramento della sopravvivenza dal cancro viene attenuato dall'aumentato rischio cardiovascolare nelle pazienti con cancro mammario e definisce gli effetti della terapia adiuvante la multiple-hit hypothesis. La modifica dello stile di vita, specialmente l'esercizio fisico regolare, e l'identificazione delle pazienti a rischio aumentato possono ridurre la mortalità. Il primo tassello è proprio la condizione di rischio delle pazienti al momento della diagnosi di tumore mammario. Su questo rischio basale si stratificano gli hits successivi dovuti ad antracicline, trastuzumab, radioterapia toracica ed ormonoterapia con conseguente aumento della vulnerabilità cardiovascolare e, quindi, del rischio di mortalità prematura cardiovascolare. Il 50% delle donne che sviluppa il cancro mammario si situa in una fascia di età >61 anni, e sembra anche che l'inattività fisica incrementi il rischio di cancro mammario, potrebbe derivare che l'inattività fisica e l'obesità siano più frequenti nelle pazienti con tumore mammario con un rischio cardiovascolare quindi presente prima della terapia adiuvante. L'osservazione di un aumento significativo di morti non legate al tumore nelle pazienti sopravvissute al tumore mammario ed il dato statistico che la cardiopatia ischemica è la prima causa di morte delle donne in tutti i paesi industrializzati hanno finalmente focalizzato l'attenzione sulla cardiopatia ischemica nella donna. La sua incidenza non è in calo come viene osservato nell'uomo, è 4 volte maggiore della somma della mortalità per cancro mammario BPCO, incidenti, cancro del polmone, non è stata altrettanto studiata (gli studi epidemiologici hanno arruolato prevalentemente maschi) ed è assolutamente recente l'interesse verso una specificità della malattia coronarica nella donna dovuta ad un diverso impatto dei fattori di rischio e ad una diversità del processo aterosclerotico. L'osservazione che tutti i recettori degli ormoni

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

sessuali e lenzima aromatasi sono espressi nelle cellule endoteliali vascolari, nelle cellule muscolari lisce vasali e nei miocardiociti apre dei nuovi scenari; gli effetti a lungo termine della terapia adiuvante si inseriscono nella predisposizione alle malattie cardiovascolari delle donne in post menopausa. Necessitano, quindi, dei markers pre-clinici di cardiotoxicità. Per il danno da antracicline il lavoro di MS Ewer (JCO, 2008) pone in discussione il significato della frazione di eiezione nel monitoraggio della cardiotoxicità: Left ventricular Ejection Fraction: is our ear really to the ground to hear the horses of cardiac toxicity galloping toward us before being trampled?. Un assunto universalmente noto è quello che considera una riduzione della EF come manifestazione di cardiotoxicità, ma un valore immutato non garantisce che non ci sia stato un danno al miocardiocita. Non è sufficientemente apprezzato il fatto che il cuore normale ha delle enormi riserve contrattili e che quando il ventricolo sinistro è disfunzionante il miocardio ha esaurito tutte le possibilità di compenso. Quindi attendere il declino della frazione di eiezione vuol dire rassegnarsi allirreversibilità del danno. Ci sono prove che il danno al miocardiocita da parte delle antracicline si verifici a dosi cumulative inferiori rispetto a quelle raggiunte quando si osserva un declino della frazione di eiezione, le alterazioni biotiche si osservano molto prima. Ogni challenge con antracicline è uno stressor che lascia un danno latente che diventerà manifesto quando un successivo stressor esaurirà le possibilità di compenso. Lulteriore stressor può essere un nuovo farmaco (per esempio trastuzumab) od un altro fattore di rischio cardiovascolare (età avanzata, precedente cardiopatia, ipertensione con ipertrofia ventricolare sinistra). Il rilascio di troponina sembra esser un marker sicuramente più precoce di danno miocardico, quando il danno è ancora parcellare e non si accompagna ad una visibile riduzione della performance globale del cuore. La determinazione della troponina sembra poter predire, con anticipo, la presenza di una disfunzione ventricolare sx clinicamente significativa, il grado e la severità della futura disfunzione ventricolare sx. Studi dei cardiologi dellIEO hanno mostrato che la persistente positività della troponina (1 mese dopo lultima somministrazione di antracicline) è legata ad una probabilità dell85% di eventi cardiaci maggiori nel I anno di follow up, mentre una troponina persistentemente negativa può identificare con un valore predittivo negativo del 99% i pazienti con il minore rischio di cardiotoxicità che molto probabilmente non andranno incontro a complicanze cardiache almeno nel I anno dopo la CHT. Studi con nuove metodiche ecocardiografiche che valutino lo strain e lo strain rate sembrano essere altrettanto promettenti. La cardiotoxicità delle 5-Fluoropirimidine è rara e si estrinseca clinicamente come manifestazioni di cardiopatia ischemica e con episodi reversibili di scompenso cardiaco. Il meccanismo delle manifestazioni di cardiopatia ischemica è stato generalmente attribuito a vasospasmo coronarico in pazienti senza fattori di rischio per aterotrombosi e questa ipotesi è stata validata sia mediante dimostrazione angiografica di alterazioni reversibili trinitrino-sensibili delle coronarie epicardiche, sia dalla normalità del test da sforzo effettuato nei pazienti dopo la sospensione del 5-Fluorouracile, che confermava la natura funzionale e non organica del restringimento coronarico. La cardiotoxicità delle 5-Fluoropirimidine, però, non è ascrivibile soltanto ad un meccanismo vasospastico, infatti si verifica più frequentemente in pazienti con fattori di rischio cardiovascolare e, nella nostra esperienza, si accompagna a manifestazioni cliniche di cardiopatia ischemica prevalentemente con la dimostrazione angiografica di ostruzione coronarica. Studi sperimentali sull'endotelio vascolare dei conigli avevano dimostrato un meccanismo protettivo di un trattamento antitrombotico con eparina a basso peso molecolare nei confronti di un effetto trombogenico del 5-fluorouracile e, successivamente, un effetto trombogenico del 5-FU secondario ad un effetto tossico diretto sull'endotelio, forse mediato da generazione di radicali e prevenibile mediante pretrattamento con un antiossidante come il probucolo. Altri studi hanno mostrato come la somministrazione di una singola dose di 5-FU nel coniglio possa determinare infarto miocardico emorragico con spasmo delle coronarie epicardiche, mentre una successiva infusione può provocare ispessimento delle arteriole intramiocardiche ed una apoptosi disseminata nelle fibrocellule miocardiche dell'epicardio e delle cellule endoteliali delle coronarie più distali. Questi risultati dimostrano che lo spasmo delle coronarie epicardiche non è l'unico meccanismo di cardiotoxicità del 5-FU e che l'apoptosi delle cellule miocardiche ed endoteliali può dar luogo ad una lesione infiammatoria simile a quella indotta dalla miocardite tossica.

La radioterapia toracica può determinare effetti collaterali precoci e tardivi nelle donne con cancro mammario se parti del cuore vengono comprese nel campo di irradiazione. Dagli anni 60 sono state descritte alterazioni elettrocardiografiche dopo radioterapia per k mammario. Lindahl et al nel 1983 hanno riportato un'incidenza del 35% di alterazioni dell'onda T in pazienti post radioterapia mammaria. Le anomalie erano legate all'irradiazione del mediastino con una dose media di radiazioni che superava i 20 Gy. Le alterazioni venivano considerate funzionalmente non significative. Nel 1994 Valagussa descriveva una maggiore incidenza di effetti cardiotoxici in pazienti irradiate a sx, che avevano ricevuto CHT adiuvante, con un'età al momento della chirurgia >55 anni ed in donne con fattori di rischio per cardiopatia ischemica. Nuovi difetti di perfusione fissi sono stati descritti da Geynes e coll nel 50% dei pazienti con k mammario sx dopo radioterapia, usando il 99mTc-sestamibi. La localizzazione del difetto correlava con il volume irradiato del ventricolo sx. Modifiche della perfusione miocardica alla SPECT sono state descritte nel 60% delle pazienti trattate con RT e doxorubicina, 6 mesi dopo il trattamento, da Hardenbergh e collaboratori nel 2001. Uno studio di Seddon e coll del 2002 in pazienti con k mammario sx e dx ha mostrato un significativo incremento dei difetti di perfusione nelle pazienti con mammella sx, ma il follow up a 5 anni non aveva documentato eventi clinici significativi. La persistenza dei difetti di perfusione, oltre i 2 anni (3-5 anni), veniva anche dimostrata da Yu, Hardenbergh e Prosnitz nel 2004: l'86% delle pazienti con un difetto di perfusione 6-24 mesi post RT mostrava la

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

persistenza del difetto, mentre il 50% delle pazienti con uno scan 6-24 mesi dopo RT anormale in maniera intermittente mostrava uno scan patologico 3-5 anni dopo, quindi nuovi difetti di perfusione si possono rilevare 3-4 anni dopo. Lo stesso gruppo di lavoro mostrava nel 2005 la presenza di difetti di perfusione nel 40% delle pazienti entro 2 anni dalla RT, associati a corrispondenti anomalie cinetiche. Gli stessi autori in un lavoro osservazionale rilevano una maggiore frequenza di sintomi consistenti con cardiopatia ischemica nelle pazienti con difetti di perfusione scintigrafici conferendo ai difetti un significato clinico. Nel 2006 un lavoro di Harris e Correa confronta la mortalità tardiva in pazienti con tumore mammario allo stadio iniziale: pazienti con k mammario sx versus pazienti con k mammario dx in un periodo di follow up di 20 anni. In questo studio l'irradiazione della mammella sx non si associava ad un rischio di morte maggiore, ma ad un aumento statisticamente significativo di manifestazioni di cardiopatia ischemica: dolore toracico, infarto del miocardio.

Anche per la cardiotossicità della radioterapia toracica necessitano markers pre-clinici: il danno micro vascolare evidenziato dalle metodiche scintigrafiche di perfusione sembra promettente.

Gli studi su pazienti con tumore mammario sinistro in fase iniziale da trattare e già trattate e su pazienti con neoplasie del tratto gastroenterico da trattare con 5-Fluoropirimidine si propongono di valutare l'incidenza delle alterazioni perfusionali miocardiche dopo trattamento chemioterapico e/o radioterapia toracica, la transitorietà (stress-indotta) o la fissità delle alterazioni, la reversibilità o persistenza nel tempo, la eventuale dipendenza dal tipo di Radioterapia utilizzato, il valore predittivo delle alterazioni perfusionali per manifestazioni di cardiopatia ischemica. Viene perseguito inoltre l'obiettivo di sensibilizzare i pazienti al controllo degli altri fattori di rischio cardiovascolari con modifiche dello stile di vita e con interventi farmacologici aggressivi.

Risultati e prodotti conseguiti: Nell'ambito degli studi Osservazionali sulla Cardiotossicità del trattamento combinato Antraciline/Radioterapia e 5-fluorouracile/capecitabina, in pazienti con Carcinoma Mammario Sx, sono state ad oggi arruolate rispettivamente 16 e 17 pazienti, attualmente in corso di valutazione.

Aggiornamento 2010

L'attività è stata articolata in 3 sottoprogetti:

1 -Studio osservazionale sulla cardiotossicità del trattamento combinato antracicline/radioterapia emitorace sinistro, in pazienti con tumore mammario sinistro in fase iniziale, valutata mediante tomoscintigrafia miocardica protocollo stress/rest effettuata prima e dopo il trattamento combinato e follow up clinico.

Arruolati 44 pazienti, di cui 11 nel 2010,

2 - Studio osservazionale sulla cardiotossicità del trattamento combinato antracicline/radioterapia emitorace sinistro in pazienti con esiti di chirurgia radicale per carcinoma mammario sinistro in fase iniziale. Valutazione mediante tomoscintigrafia miocardica perfusionale protocollo stress/rest.

Arruolati 50 pazienti, con i dati preliminari è stato pubblicato un lavoro con la descrizione di 3 casi clinici. È stato accettato (dicembre 2010) il lavoro The clinical impact of a cardiologic follow up in breast cancer survivors: an observational study sulla rivista International Journal of Immunopathology and Pharmacology.

Studio chiuso come arruolamento alla fine del 2009, continua l'osservazione.

3 - Studio osservazionale sulla cardiotossicità del trattamento con 5-Fluoropirimidine (5-Fluorouracile in infusione continua, Capecitabina). Ruolo dei fattori di rischio cardiovascolari. Valore predittivo dei markers di aterotrombosi. Efficacia di trattamento farmacologico aggressivo dei fattori di rischio cardiovascolari e delle patologie cardiovascolari.

Arruolamento chiuso nel dicembre 2010, in attesa del lavoro

Arruolati 79 pazienti, di cui 12 nel 2010

In aggiunta, sono stati avviati 2 sottoprogetti che hanno prodotto altrettante pubblicazioni:

4 - The clinical impact of a cardiologic follow-up in breast cancer survivors: an observational study pubblicato sull' International Journal of Immunopathology and Pharmacology (2010 Pct-Dec;23(4):1221-7

Lo studio ha arruolato pazienti con early breast cancer in follow-up, trattate con chemioterapia contenente antracicline e

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

con radioterapia toracica. Lo scopo dello studio era la dimostrazione dell'utilità di una valutazione cardiovascolare accurata per slantizzare danni precoci da chemioterapia e/o da radioterapia toracica. Le pazienti, generalmente asintomatiche o con sintomatologia aspecifica, venivano sottoposte a valutazione cardiologica completa con esame elettrocardiografico, ecocardiografico e scintigrafico miocardico con protocollo stress/rest. Sono state studiate 30 pazienti: in 7 pazienti sono state riscontrate alterazioni reversibili della perfusione miocardica, in 1 paziente un deficit fisso, una paziente ha mostrato una frazione di eiezione depressa con normale perfusione, 1 paziente con sintomatologia atipica ha mostrato un ampio difetto di perfusione ed è stata sottoposta a coronarografia e successiva rivascolarizzazione. Le pazienti con piccoli difetti di perfusione non hanno mostrato alterazioni delle coronarie epicardiche all'angio TC coronarica avvalorando l'ipotesi che il danno da radioterapia toracica sia a livello endoteliale microvascolare. Il test da sforzo combinato con uno studio della perfusione miocardica ci può fornire informazioni preziose sulla riserva coronarica e sulla riserva contrattile di queste pazienti in cui una cardiotossicità tardiva aggiunge un considerevole burden al rischio cardiovascolare. L'individuazione di markers preclinici di cardiotossicità porta ad un trattamento precoce e personalizzato che dovrebbe prevenire ulteriori e più gravi manifestazioni di cardiopatia ischemica o di scompenso cardiaco e, da ultimo, portare a riduzione della mortalità cardiovascolare.

5 - Contractile Reserve as a Marker of Preclinical Cardiotoxicity pubblicato su JCO 2010 Dec 20;28(36):e769. Epub 2010 Nov 15. La lettera è stata un commento all'articolo della dottoressa Cardinale sulla cardiotossicità da trastuzumab e sul significato clinico e prognostico della valutazione della troponina. Nella lettera vengono poste delle domande sui pazienti arruolati e, soprattutto, sullo studio della riserva contrattile. Vengono anche illustrati alcuni risultati di uno studio osservazionale effettuato nel nostro centro in cui pazienti trattate con chemioterapia contenente antracicline e radioterapia toracica vengono studiate con scintigrafie miocardica protocollo stress /rest e metodica GATED. In alcune pazienti non è stato osservato l'atteso incremento della frazione di eiezione dopo stress. Una blunted risposta miocardica potrebbe essere un marker precoce di danno al miocardiocita dopo la somministrazione di antracicline. L'inficiata contrattilità derivante dalla somministrazione di antracicline potrebbe essere ulteriormente peggiorata dalla successiva terapia con trastuzumab, Si propone lo studio della riserva contrattile per una migliore valutazione delle pazienti candidate a terapia combinata antracicline/trastuzumab.

Attività previste Pazienti con tumore mammario sinistro in fase iniziale.

Primo studio: Vengono arruolati pazienti da trattare con chemioterapia (comprendente antracicline) e con radioterapia dellemitorace sinistro. Le pazienti vengono sottoposte a valutazione cardiologica completa con elettrocardiogramma e visita cardiologica, ad esame ecocardiografico con studio della dimensioni delle cavità cardiache, della funzione sistolica, della funzione diastolica e degli apparati valvolari. Lo studio della perfusione miocardica BASALE viene effettuato mediante tomoscintigrafia miocardica protocollo stress/rest con metodica Gated per la funzione ventricolare sinistra. Lindagine viene ripetuta dopo il trattamento chemioterapico e radioterapico. Le pazienti effettuano successivi controlli clinici semestrali e controlli scintigrafici ogni 2 anni.

Secondo studio: vengono arruolati pazienti consecutive già trattate con chemioterapia comprendente antracicline e radioterapia toracica, in follow up. Anche questa coorte di pazienti viene sottoposta a valutazione cardiologica completa e a studio della perfusione miocardica mediante scintigrafia miocardica protocollo stress/rest con metodica Gated. Per entrambi i gruppi, le pazienti con alterazioni perfusionali parcellari vengono sottoposte a Tomografia Computerizzata Multislice per imaging coronarico per escludere patologia delle coronarie epicardiche. Le pazienti con alterazioni perfusionali più estese vengono avviate a valutazione emodinamica tradizionale per eventuale terapia interventistica.

Pazienti in terapia con 5 Fluoropirimidine.

Nello studio vengono arruolati pazienti con neoplasie del tratto gastroenterico da trattare con 5-Fluoropirimidine. Obiettivi sono: valutare l'incidenza degli effetti cardiotossici del 5-Fluorouracile e della Capecitabina in pazienti con neoplasie del tratto gastroenterico; il ruolo dei fattori di rischio cardiovascolare ed il valore predittivo dei markers di aterotrombosi (spessore medio-intimale o IMT, sclerosi aortica e rapporto pressione arti inferiori/pressione arti superiori o ABI index) nel determinismo della manifestazioni di cardiopatia ischemica; valutare inoltre l'efficacia di un trattamento aggressivo dei fattori di rischio cardiovascolari e se questo intervento determini riduzione degli eventi cardiotossici. I pazienti vengono sottoposti a valutazione cardiologica basale con elettrocardiogramma standard, visita cardiologica, ecocardiocolordoppler, misurazione dello spessore intima-media (IMT) della carotide comune e a misurazione del rapporto pressione arti inferiori/pressione arti superiori (ABI index). I pazienti con fattori di rischio cardiovascolare vengono trattati con terapia ottimizzata con il target dei valori di PA e di colesterolemia LDL dei pazienti ad alto rischio. I pazienti vengono sottoposti a rivalutazione cardiologica con ECG e visita al II giorno dell'infusione continua di 5-FU o dopo la somministrazione di Capecitabina. Nei casi in cui siano presenti modifiche elettrocardiografiche di tipo ischemico o sintomatologia dolorosa toracica (con o senza modifiche elettrocardiografiche) viene effettuato ecocardiogramma e misurazione dei markers di citonecrosi (CKMB e Troponina). Viene inoltre valutata la necessità

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

di imaging coronarico non invasivo (MSCT) o, nei casi con danno miocardio esteso, imaging invasivo mediante angiografia tradizionale per eventuale rivascolarizzazione.

4 : La qualità della vita sessuale e affettiva delle donne dopo diagnosi di tumore della mammella

Responsabile: PETRILLI FILOMENA

Programma:

Parole chiave: sessualità, tumore alla mammella

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2009

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Terapeutica

Descrizione: Quando una persona si trova costretta a vivere l'esperienza di una malattia tumorale, tutta la sua esistenza ne risulta sconvolta, alla prima fase di shock indotta dalla diagnosi, si susseguono quelle della terapia, medica, chirurgica, radiante o tutte insieme, in un turbine che stravolge equilibri personali, familiari e sociali e tocca tutti gli ambiti della vita. Ci si trova a confrontarsi con sentimenti forti, magari immaginati, ma che nessuno si augura di provare, quale paura e preoccupazione per la propria vita, dolore, ansia, depressione, rabbia, senso di colpa e con situazioni nuove come la degenza in ospedale, le visite mediche, i cambiamenti nel proprio corpo e nell'aspetto e tanto altro che mettono in discussione l'identità personale, i valori, l'autostima, la progettualità, la vita affettiva e sessuale del soggetto. La malattia tumorale, quindi, può determinare dei cambiamenti del funzionamento sessuale sia a livello fisico che psicologico, ma è importante che la persona affetta comprenda che non necessariamente la malattia comporta la rinuncia alla vita sessuale. La sessualità viene vissuta e valutata in maniera del tutto individuale e comprende tanti e diversi aspetti che non è possibile generalizzare, infatti l'impatto di questi cambiamenti varia da soggetto a soggetto e dipende anche dal significato e dal valore che egli attribuiva alla sessualità prima della malattia, dalla fase della vita al momento della diagnosi, dal tipo di malattia e di organo colpito, dal tipo di terapia e dalla qualità della relazione di coppia. Questo studio è rivolto alle donne che hanno avuto una diagnosi di tumore alla mammella e che per questo si sono dovute sottoporre a terapie mediche e/o chirurgiche e/o radianti. La finalità è conoscere la qualità della vita sessuale e affettiva delle donne e delle coppie dopo la diagnosi e la terapia di tumore della mammella per individuare nuove prospettive e cercare di aiutare queste donne a migliorare la qualità della loro vita in generale e in campo sessuale in particolare.

Risultati e prodotti conseguiti: Sono state intervistate 100 donne con diagnosi di tumore mammario (nel 35% da oltre 5 anni) di 32-74 anni di età (media 50 anni) di cui 73 sposate o con una relazione stabile. Le difficoltà relative alla sessualità e alla funzione sessuale ed i problemi relativi all'immagine corporea sono stati sperimentati da un nutrito gruppo di donne e si sono verificati non solo precocemente dopo il trattamento chirurgico o chemioterapico adiuvante, ma anche a distanza di tempo. Oltre la metà (59 donne) ha provato 1 o più problemi di immagine corporea che rappresenta il principale motivo di danno alla qualità della vita sessuale. La maggior parte di questi problemi si associa alla mastectomia (31%), infatti solo 4 mastectomizzate (13%) rispondono di non notare nessun cambiamento rispetto alle 27 (43%) che hanno subito la quadrantectomia. Le donne mastectomizzate e quelle con quadrantectomia si percepiscono rispettivamente meno attraenti nel 38% e nel 26%, mutilate nel 34% e nel 6%. A questi problemi si associano anche sentimenti di paura nel 45%, tristezza (37%), stress (33%), bassa autostima (7%), senso di colpa (7%) e timore soprattutto degli effetti collaterali delle terapie (56%) e delle mutilazioni (18% delle quadrantectomizzate contro il 21% delle mastectomizzate).

AGGIORNAMENTO 2010

Sono state intervistate 40 donne affette da tumore mammario, 10 donne con carcinoma dell'endometrio, 6 con tumore della cervice, 8 con tumore allovaio.

Sono stati somministrati 10 questionari a donne affette da tumori diversi da quelli della sfera sessuale.

Letà complessiva varia da 30-74 anni di età (media 45 anni).

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Le difficoltà relative alla sessualità e alla funzione sessuale ed i problemi relativi all'immagine corporea sono stati sperimentati da un nutrito gruppo di donne e si sono verificati non solo precocemente dopo il trattamento chirurgico o chemioterapico adiuvante, ma anche a distanza di tempo.

Oltre la metà (60 donne) ha provato 1 o più problemi di immagine corporea che rappresenta il principale motivo di danno alla qualità della vita sessuale. La maggior parte di questi problemi si associa alla mastectomia, alla presenza di stomia cutanea e alle cicatrici chirurgiche, infatti queste donne si percepiscono meno attraenti nel 38% e mutilate nel 34%.

A questi problemi si associano anche sentimenti di paura nel 45%, tristezza (37%), stress (33%), bassa autostima (7%), senso di colpa (7%) e timore soprattutto degli effetti collaterali delle terapie (56%) e delle mutilazioni.

Un numero significativo di pazienti (80%) si è dichiarato soddisfatto della propria vita sessuale e della relazione con il partner prima della malattia, soddisfazione complessivamente ridotta dopo la malattia ed i trattamenti (50%).

Tra le donne sessualmente attive (95%), circa la metà ha riferito un problema in due o più aree della funzione sessuale dopo la malattia, con incremento della quota che non ha più nessuna attività sessuale, calo del desiderio, eccitazione e lubrificazione assente o molto bassa e orgasmo sperimentato raramente, verbalmente alcune donne hanno imputato il decadimento della loro relazione affettiva e sessuale alla mancanza di desiderio e iniziativa del partner o alle sue difficoltà sessuali.

I maggiori problemi sessuali femminili erano associati a turbe menopausali, quali vampate / sudorazioni (80%) e secchezza vaginale (36%), a dispareunia (44%), a disturbi urinari ((35%), a problemi di immagine corporea (60%) e a malessere psicologico.

Le risposte ai questionari somministrati alle donne con tumori non ginecologici e non mammari non sono ancora pervenute.

Attività previste Estendere lo studio a donne affette da altre patologie tumorali, e valutare le eventuali differenze di risposta rispetto a quelle affette da tumore mammario.

Raccolta dei dati

Per la raccolta dei dati viene utilizzato un questionario anonimo, somministrato alle donne che, sono state ricoverate nel reparto di Oncologia Medica, nel Day hospital oncologico o che hanno frequentato l'ambulatorio di Follow-up (Breast Unit) e l'ambulatorio di Ginecologia Oncologica, o che sono state sottoposte a Radioterapia presso il nostro Istituto. Le donne sono informate sulla motivazione del questionario, sulla modalità di compilazione e che sarebbe rigorosamente rimasto anonimo, pertanto dopo la compilazione, doveva essere riposto in una busta da riconsegnare chiusa. Il questionario è composto da: 1.introduzione per presentare il questionario; 2.sezione che riguarda le generalità, la raccolta anamnestica, la vita sessuale e affettiva prima della malattia, la percezione del proprio stato di salute e dell'immagine corporea, l'emotività e la qualità della vita attuale; 3.sezione che riguarda la vita affettiva e sessuale negli ultimi tre mesi.

5 : Il rischio individuale oncologico: definizione, modifica e valutazione di impatto

Responsabile: Galasso Rocco

Programma:

Parole chiave: Tumori, Rischio individuale, Abitudini di vita

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2009

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Prevenzione

Descrizione: In Basilicata si assiste ad un aumento dell'incidenza per tutte le patologie tumorali ed il confronto dei trend rilevati in Basilicata con quelli italiani mette in evidenza che negli anni 2009-2010 si assisterà ad un incrocio delle linee di trend di incidenza. Infatti mentre per l'Italia i tassi di incidenza hanno raggiunto il loro massimo negli anni 90 ed oggi sono in diminuzione, per la Basilicata che aveva incidenza inferiore sono in crescita e non si rileva alcuna tendenza nella inversione come si è verificato in Italia. A questa situazione di fatto si aggiungono le conoscenze che derivano da altre indagini (es. Indagine Multiscopo ISTAT 2007) che mostrano un progressivo peggioramento delle abitudini di vita che sono fattori di rischio

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

modificabili noti per le malattie tumorali (e cronico degenerative in genere) e ciò è soprattutto evidente per le età più giovani. Per molti questi la Basilicata è la peggiore fra le regioni italiane e dove sono state valutate serie annuali si vede come le tendenze sono verso un ulteriore peggioramento. Tale stato porta ad ipotizzare che un eventuale calo dei tassi di incidenza si possa verificare in Basilicata con ritardo rispetto a quello odierno italiano di almeno 10 anni; ovviamente considerando che anche quanto descritto per i fattori di rischio si modifichi come sta avvenendo in Italia. Quanto esposto indica come sia di estrema necessità avviare tutte le azioni in grado di modificare favorevolmente tale tendenza in modo da rendere quanto prima sovrapponibili i trend della Basilicata con quelli italiani non solo per quanto riguarda l'incidenza delle malattie tumorali ma anche per i fattori di rischio modificabili utilizzando tutte le armi della prevenzione primaria.

Si propone pertanto di elaborare due strumenti di valutazione del rischio globale assoluto: le carte del rischio ed il punteggio individuale partendo da un rischio tumorale globale assoluto quale indicatore che permette di valutare la probabilità di ammalare di un tumore conoscendo il livello di alcuni fattori di rischio con una valutazione globale degli stessi che rispetta leziologia multifattoriale della malattia oncologica. Il suo valore verrà stimato per ogni individuo a partire dai principali fattori di rischio presenti.

Successivamente si propone la diffusione presso tutti gli attori del sistema sanitario regionale di queste carte del rischio individuale e/o di programmi in grado di calcolare il rischio individuale immettendo alcuni parametri di rischio su Internet e presso MMG, Farmacie, Ospedali, Distretti Sanitari di Base. Contemporaneamente verranno avviate campagne di informazione per la popolazione adulta e per le età più giovani con la costruzione di una sorta di help desk e/o community e/o forum di discussione su Internet per attivare un counselling continuo e diffondere la cultura della prevenzione basata su sane abitudini di vita.

Obiettivo finale:

Accelerare i tempi per la prevedibile inversione dei trend di incidenza per le malattie neoplastiche.

Modificare le abitudini di vita che sono fattori di rischio noti

Risultati e prodotti conseguiti: E in corso la fase di revisione della letteratura e la ricerca delle fonti

Progetto è iniziato nel 2009; completata la ricerca bibliografica, è stato presentato come proposta di progetto per il piano della prevenzione regionale e si è in attesa di risposte per il finanziamento.

Nell'ambito del progetto concluso nel 2009 Sviluppo, introduzione e valutazione di efficacia di un sistema informativo a supporto della decisione clinica nel corso del 2010 è stato pubblicato il lavoro:

Damiani G, Pinnarelli L, Colosimo SC, Almiento R, Sicuro L, Galasso R, Sommella L, Ricciardi W. The effectiveness of computerized clinical guidelines in the process of care: a systematic review. BMC Health Serv Res. 2010 Jan 4;10:2. (IF:1.680)

Nell'ambito della collaborazione con il progetto EPIC nel corso del 2010 è stato pubblicato il lavoro:

Dossus L, Becker S, Rinaldi S, Lukanova A, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Chabbert-Buffet N, Boutron-Ruault M, Clavel-Chapelon F, Teucher B, Chang-Claude J, Pischon T, Boeing H, Trichopoulos A, Benetou V, Valanou E, Palli D, Sieri S, Tumino R, Sacerdote C, Galasso R, Redondo M, Bonet Bonet C, Molina-Montes E, Altzibar J M, Chirlaque M, Ardanaz E, Bas Bueno-de-Mesquita H, van Duijnhoven FJB, Peeters PHM, Onland-Moret NC, Lundin E, Idahl A, Khaw K, Wareham N, Allen N, Romieu J, Fedirko V, Hainaut P, Romaguera D, Norat T, Riboli E, Kaaks R. Tumor necrosis factor (TNF)- α soluble TNF receptors and endometrial cancer risk: the EPIC study. Int J Cancer. 2010. Dec 10; (IF:4.722)

Attività previste: Creazione della carte del rischio e del punteggio individuale.

Creazione di software specifici per il calcolo, pubblicabili anche su Internet.

Diffusione di questi strumenti presso tutte le strutture sanitarie e presso i MMG

Avvio di campagne di informazione per la popolazione generale con particolare riguardo per le età più giovani.

Pianificazione
Linee di ricerca (2A) Programmi Progetti (2B) Scheda finanziaria (2C) Ricercatori Produttività Pubblicazioni
Trials clinici Attività assistenziale Potenzialità progetti Modulistica Dichiarazione sostitutiva Finanziamenti linee di ricerca Descrizione linee di ricerca Elenco programmi Elenco progetti Scheda finanziaria Elenco trials clinici Elenco banche materiale biologico Elenco ricercatori Elenco pubblicazioni

6 : Il Registro Tumori di Basilicata come sistema di sorveglianza: flussi di mortalità

Responsabile: Galasso Rocco

Programma:

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Parole chiave: Registro Tumori, Mortalità

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2009

Durata: 36

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Descrittiva

Descrizione: In Basilicata si assiste ad un aumento dell'incidenza per tutte le patologie tumorali ed il confronto dei trend rilevati in Basilicata con quelli italiani mette in evidenza che negli anni 2009-2010 si assisterà ad un incrocio delle linee di trend di incidenza. Infatti mentre per l'Italia i tassi di incidenza hanno raggiunto il loro massimo negli anni 90 ed oggi sono in diminuzione, per la Basilicata che aveva incidenza inferiore sono in crescita e non si rileva alcuna tendenza nella inversione come si è verificato in Italia. A questa situazione di fatto si aggiungono le conoscenze che derivano da altre indagini (es. Indagine Multiscopo ISTAT 2007) che mostrano un progressivo peggioramento delle abitudini di vita che sono fattori di rischio modificabili noti per le malattie tumorali (e cronico degenerative in genere) e ciò è soprattutto evidente per le età più giovani. Per molti questi la Basilicata è la peggiore fra le regioni italiane e dove sono state valutate serie annuali si vede come le tendenze sono verso un ulteriore peggioramento. Quanto sopra esposto indica come sia di estrema necessità avviare tutte le azioni che permettono un sorveglianza del fenomeno che garantisca la tempestività nella collezione dei dati e nella diffusione delle informazioni ai fini della programmazione e pianificazione, organizzazione sanitaria e valutazione degli interventi di prevenzione. Ciò permette una valutazione complessiva dell'efficacia del sistema sanitario per i tumori e la stima e previsione della domanda sanitaria per il settore delle malattie tumorali.

Il Registro Tumori è di fatto un sistema di sorveglianza che presenta evidenti e noti limiti sulla tempestività. Molto si può fare per migliorare la velocità con cui affluiscono di interesse.

L'informatizzazione dei flussi nel luogo stesso in cui si generano evita trascrizioni ed errori ed è una delle azioni che si può mettere in atto per migliorare la tempestività. A tale riguardo un progetto recentemente conclusosi ha di fatto messo in rete il servizio di anatomia patologica della regione Basilicata garantendo un flusso informatizzato delle diagnosi verso il registro tumori.

Il flusso dati di mortalità per malattie tumorali è un aspetto che merita azioni per una migliore e più rapida fruibilità degli stessi in modo da integrare gli strumenti per la sorveglianza delle malattie tumorali. I punti critici sono nei flussi dati dai comuni della Basilicata verso il Registro Tumori ed in particolare il modello Istat AP/USL/2 elenco nominativo dei morti che deve contenere anche l'indicazione del comune di morte per rintracciare la scheda di morte presso la AUSL competente per territorio.

Obiettivo finale

Accelerare i tempi di produzione di reportistica con le statistiche di mortalità mediante la creazione di procedure in grado di variane la velocità di acquisizione e quindi di pubblicazione e diffusione delle informazioni.

Risultati e prodotti conseguiti: È stato definito il tracciato record. Al momento il progetto è fermo in attesa di valutare i risultati del processo di armonizzazione delle anagrafi comunali in corso.

Progetto iniziato nel 2009, è stato definito il tracciato record. Sono state recuperate dagli ambiti territoriali delle Aziende Sanitarie Locali di Potenza e Matera le schede di morte relative agli anni 2005-2007. Le stesse presentano notevoli difformità relativamente alla informatizzazione (da tutta la scheda a niente) alla codifica ed alla completezza della rilevazione.

AGGIORNAMENTO 2010

È in corso l'attività relativa alla armonizzazione delle procedure di raccolta dati da parte delle ASL e la definizione di protocolli operativi che coinvolgono i comuni della Basilicata per la valutazione del grado di completezza delle schede di mortalità che pervengono alle ASL e la richiesta delle stesse alle ASL sede dell'evento morte per i residenti della Basilicata.

Attività previste: Creazione di procedure di export su tracciato record definito per ciascuno dei 135 comuni della Basilicata e contestuale procedura di import sui database del registro tumori.
Produzione di statistiche di mortalità per tumore.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Produzione di statistiche di sopravvivenza per tumore.

Pianificazione Linee di ricerca (2A) Programmi Progetti (2B) Scheda finanziaria (2C) Ricercatori Produttività Pubblicazioni Trials clinici Attività assistenziale Potenzialità progetti Modulistica Dichiarazione sostitutiva Finanziamenti linee di ricerca Descrizione linee di ricerca Elenco programmi Elenco progetti Scheda finanziaria Elenco trials clinici Elenco banche materiale biologico Elenco ricercatori Elenco pubblicazioni
Utilità Cambia password

7 : Supporto psicologico ai pazienti oncologici: analisi delle problematiche relative al tumore della mammella e al trapianto di cellule staminali .

Responsabile: Tartaglia Tiziana

Programma:

Parole chiave:

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2010

Durata: 24

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Terapeutica

Descrizione: 1 STUDIO

Valutazione della qualità di vita e della soddisfazione nelle donne con cancro al seno sottoposte a intervento chirurgico ricostruttivo

Dall'analisi della letteratura emerge che gli studi disponibili circa l'esito del trattamento di ricostruzione post-mastectomia in termini di soddisfazione soggettiva, risultano piuttosto eterogenei. Solo alcuni autori concludono che i risultati potrebbero essere riconducibili alle caratteristiche psicologiche delle pazienti, ma pochi studi si è finora proposto di indagare quali di questi fattori psichici e di personalità possono influenzare tale esito. Per approfondire le conoscenze in questo ambito e chiarire alcuni motivi delle discordanze fra le diverse ricerche, intendiamo condurre uno studio con l'obiettivo di valutare da quali fattori basali socio-demografici, clinici e da quali strategie di coping dipendono le variazioni della qualità della vita e di soddisfazione soggettiva in un gruppo di pazienti che hanno subito mastectomia per carcinoma mammario e che si sono sottoposte ad intervento ricostruttivo immediato o differito. In particolare, per queste pazienti si ipotizza che la percezione del supporto sociale e l'adozione di più funzionali strategie di coping favoriscano un migliore adattamento alla situazione e di conseguenza un miglior livello di soddisfazione rispetto all'esito dell'intervento.

Il concetto di coping fa riferimento alla modalità con cui le persone cercano di gestire eventi traumatici o situazioni quotidiane stressanti. Le strategie di coping sono state descritte e classificate in vari modi, e questo dimostra l'effettiva molteplicità delle modalità a disposizione del soggetto. In generale, le risposte di coping comprendono sia tutte le decisioni e le azioni adottate da un individuo di fronte a un evento stressante, sia le emozioni a esse connesse.

La maggior parte degli studi indica che le strategie di coping svolgono due funzioni principali: ridurre il rischio delle conseguenze dannose che potrebbero risultare da un evento stressante (coping focalizzato sul problema) e contenere le reazioni emozionali negative (coping focalizzato sulle emozioni). Il primo tipo di coping trova espressione in due fattori, denominati generalmente coping attivo e pianificazione.

Il secondo tipo si declina in quattro fattori: distanziamento (ad esempio, negare l'esistenza del problema o distrarsi), autocontrollo (non lasciarsi trascinare dalle proprie emozioni), assunzione di responsabilità (ritenersi più o meno responsabili della situazione) e rivalutazione positiva (riconoscere i cambiamenti che provengono dalla modificazione di una situazione, vedere la realtà da un punto di vista positivo; si veda, Carver, Scheier e Weintraub, 1989; Monat e Lazarus, 1991; Zani e Cicognani, 1999).

Un altro filone di ricerca distingue strategie finalizzate all'approccio rispetto a strategie finalizzate all'evitamento. In generale, maggiore è il senso di controllo esperito dall'individuo e maggiore è il ricorso a strategie finalizzate all'approccio. C'è una certa concordanza nel considerare la natura del coping finalizzato all'approccio più adattiva rispetto a un coping di evitamento. Quest'ultimo potrebbe essere utile nel breve termine, nel caso di presenza di eventi incontrollabili; tuttavia, è stato rilevato come nel lungo termine le risposte di evitamento non permettano di raccogliere informazioni utili sul problema compromettendo il ricorso a risorse utili (Stanton e Snider, 1993).

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Infine, un'altra prospettiva da tenere presente si è concentrata principalmente sulla descrizione dei fattori che influenzano l'acquisizione e l'uso di risposte di coping, includendo gli aspetti socio-contestuali (Carver et al., 1993).

Il supporto sociale, infatti, ha un ruolo positivo sul benessere fisico e psicologico di differenti tipi di pazienti, come i malati di cancro.

Il sostegno sociale è stato spesso considerato un moderatore della relazione evento stressante e qualità della vita, cioè si sostiene che a seguito di eventi stressanti ci sia un cambiamento nel sostegno sociale ricevuto e percepito e che ciò abbia effetti diretti e indiretti sulla qualità della vita. Secondo questo modello dopo un evento stressante si assiste a una mobilitazione del sostegno sociale ricevuto che incrementa il sostegno sociale percepito il quale a sua volta promuove la qualità della vita.

Fra le risorse in grado di ridurre l'impatto di eventi critici sulla qualità della vita, il sostegno sociale è fra le più investigate (Prati & Pietrantonio, 2009).

In conclusione, l'importanza dello stile di coping in oncologia è legato al fatto che esso si è rivelato uno dei fattori determinanti nel modulare le differenze individuali di reazione psicologica a lungo termine alla malattia e di percezione della qualità della vita.

Bibliografia

Brédart A, Mignot V, Rousseau A, Dolbeault S, Beauloye N, Adam V, Elie C, Léonard I, Asselain B, Conroy T. Validation of the EORTC QLQ-SAT32 cancer inpatient satisfaction questionnaire by self- versus interview-assessment comparison. *Patient Educ Couns.* 2004 Aug;54(2):207-12.

Carver, C.S., Scheier, M.F., & Weintraub, J.K. (1989). Assessing coping strategies: A theoretically based approach. *Journal of Personality and Social Psychology*, 56, 267-283.

Carver, C.S., Pozo, C., Harris, S.D., Noriega, V., Scheier, M.F., Robinson, D.S., Ketcham, A.S., Moffat, F.L. Jr. & Clark, K.C. (1993). How coping mediates the effects of optimism on distress: A study of women with early stage breast cancer. *Journal of Personality and Social Psychology*, 65, 375-391.

Dukes Holland K.; Holahan C. K., The Relation of Social Support and Coping to Positive Adaptation to Breast Cancer, *Psychology and Health*, 18, 1 2003 , 15 29.

Han J, Grothuesmann D, Neises M, Hille U, Hillemanns P. Quality of life and satisfaction after breast cancer operation. *Archives Gynecology and Obstetrics.* 2010 Jul; 282(1):75-82. Epub 2009 Dec 4.

Hopwood P., Fletcher I., Lee A., Al Ghazal S., A body image scale for use with cancer patients, *European Journal of Cancer* 37 (2001) 189-197.

Medina-Franco H, García-Alvarez MN, Rojas-García P, Trabanino C, Drucker-Zertuche M, Arcila D. Body image perception and quality of life in patients who underwent breast surgery. *American Surgeon.* 2010 Sep;76(9):1000-5.

Monat, A., & Lazarus, R.S. (1991). *Stress and coping: An Anthology* (3rd ed.). New York: Columbia University Press.

Nissen M.J. et al, Quality of life after breast carcinoma surgery. A comparison of three surgical procedures. *Cancer*, 2001; 91:1238-46.

Pietrantonio, L. & Prati, G. (2009). *Psicologia dell'emergenza*. Bologna: Il Mulino.

Stanton, A.L., & Snider, P.R. (1993). Coping with a breast cancer diagnosis: A prospective study. *Health Psychology*, 16-23.

Ware, J. E., Jr., Snow, K. K., Kosinski, M., & Gandek, B. (1993). *SF-36 health survey. Manual and interpretation guide*. Boston: The Health Institute, New England Medical Center.

Zani, B., & Cicognani, E. (1999). *Le vie del benessere*. Roma: Carocci.

Zimet, GD, Dahlem, NW, Farley GK, The Multidimensional Scale of Perceived Social Support. *Journal of Personality Assessment*, 52(1), 30-41, 1988.

2 STUDIO

Stress, coping e qualità di vita nei pazienti sottoposti a trapianto autologo di cellule staminali.

Il trapianto autologo di cellule staminali è da tempo una procedura terapeutica per la cura di varie forme ematologiche maligne

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

e la sua applicabilità si è progressivamente estesa ad altre forme di patologia oncologica (Bone Marrow Donors Worldwide, 2004). È un intervento terapeutico molto efficace, ma al tempo stesso molto gravoso per il malato, avendo spesso conseguenze irreversibili su vari piani: biologico, psicologico e sociale come ad es. la perdita della fecondità oppure l'invalidità lavorativa etc. (Lee et al. 2005). La persona malata si trova costretta ad affrontare un'esperienza che induce un senso di crisi, le cui manifestazioni prevalenti toccano la percezione d'integrità e l'identità personale, in quanto il senso di sé viene profondamente messo in gioco da una serie di eventi stressanti e destabilizzanti. Risulta pertanto necessario un adattamento in funzione della gravità della diagnosi, della severità del protocollo terapeutico, delle specifiche reazioni psicologiche della persona malata.

In anni recenti la ricerca si è orientata prevalentemente in rapporto al distress psicologico attivato dagli effetti della malattia onco-ematologica e delle terapie, e alla qualità della vita.

In particolare, le ricerche sono volte a comprendere le conseguenze della terapia, la natura dei processi del distress e le variabili in gioco (ad es. la personalità del malato, l'evoluzione temporale della percezione di un certo sintomo, o più in generale delle condizioni di salute, le informazioni fornite dal team sanitario ecc.). Lo scopo di questi studi è la definizione dei fattori che determinano i processi di distress con finalità di prevenzione e di cura (Kettmann & Altmaier, 2008). La letteratura contemporanea definisce il distress come una condizione estremamente complessa e determinata da una serie di variabili: le caratteristiche della malattia, la personalità del malato, il momento dell'osservazione, le relazioni sociali (ad es. i familiari, il personale sanitario) ecc. Nello studio di Lee et al. (2005) vengono individuati i segni precoci del distress al fine di comprenderne il valore predittivo in termini di rischio di psicopatologia in un percorso assistenziale post-trapianto. I risultati di varie ricerche concordano sull'importanza per quanto attiene la prevenzione del distress degli elementi relativi sia alla personalità dei pazienti, sia all'evoluzione temporale del decorso clinico-terapeutico, sia agli interventi di counseling e di psicoterapia.

Il concetto di coping è da tempo parte essenziale nella ricerca psico-oncologica. Secondo Lazarus (1993), può essere definito come lo sforzo cognitivo e comportamentale di gestire lo stress psicologico, quando questo supera un certo livello di guardia. La reazione alla malattia, legata agli stressor e alle caratteristiche personali, consente di affrontare la crisi come un momento di transizione verso successive condizioni di adattamento oppure di disadattamento. Gran parte dei lavori sono centrati sul valore adattivo e di sopravvivenza dei diversi stili di coping. Schulz-Kindermann et al. (2002), considerando sia l'evoluzione temporale sia gli stadi della malattia, hanno individuato strategie di coping buone vs. cattive. Le strategie buone sono quelle in cui la malattia è accettata, e in cui viene cercato un sostegno sociale al fine di tentare un senso di controllo della malattia. Quelle cattive includono, invece, atteggiamenti fatalistici e di rassegnazione. Non mancano, infine, lavori maggiormente centrati sull'evoluzione personale positiva che consegue ad un trapianto di cellule staminali. In un lavoro di Mc Grath (2004) l'attenzione è focalizzata sull'adattamento positivo alla malattia. L'autrice mette in risalto il ruolo fondamentale delle capacità della persona malata di rielaborare in termini positivi gli accadimenti di vita, anche attraverso la dimensione spirituale. L'esperienza clinica mostra come in alcuni pazienti si attivi un processo di resilienza che li rende maggiormente consapevoli del senso della vita, capaci di godersi maggiormente i piaceri e di sentirsi fortunati per il periodo di vita che insperatamente hanno a disposizione. Secondo l'Organizzazione Mondiale per la Salute, la QdV è definita come la percezione soggettiva che un individuo ha della propria posizione nella vita, nel contesto di una cultura e di un insieme di valori nei quali egli vive, anche in relazione ai propri obiettivi, aspettative, preoccupazioni.

Secondo alcuni autori che condividono questi orientamenti, la QdV riguarda quindi un concetto ad ampio spettro, che è modificabile in maniera complessa dalla percezione della propria salute in senso bio-psico-sociale, dal livello di indipendenza, dalle relazioni sociali e dalla interazione con il proprio specifico contesto ambientale. Una ricerca trasversale con 231 soggetti sopravvissuti alla malattia e confrontati con un gruppo di controllo (Sutherland et al. 1997) studia l'influenza del tempo trascorso dal trapianto sulla QdV. I due sottogruppi di soggetti (con trapianto effettuato da meno di tre anni e con trapianto effettuato oltre tre anni prima) differivano rispetto alla propria auto-valutazione in relazione a diverse aree. La QdV era giudicata migliore, sotto vari aspetti, quanto più distante si situavano l'evento malattia e tutte le implicazioni connesse a tale evento. Di particolare interesse era il fatto che, superato il terzo anno dal trapianto, la percezione del proprio stato di salute e il proprio adattamento miglioravano di gran lunga e, per certi versi (rispetto alle variabili vitalità, salute mentale, abilità sociali), divenivano addirittura migliori che nel gruppo di controllo. Un risultato come questo lascia spazio, secondo gli autori, a più ipotesi:

- i lungo-sopravvissuti cambiano il loro punto di prospettiva rispetto alla loro situazione personale,
- esiste una rivalutazione in senso esistenziale,
- esiste una predisposizione sulla base di caratteristiche personali (vitalità, sentimenti positivi etc.), oltre che di un forte sostegno sociale.

Questi fattori sembrano avere un ruolo importante nei processi di sopravvivenza alla malattia in termini quantitativi e qualitativi. Nonostante vi sia un crescente consenso sull'innalzamento della QdV in soggetti post-trapianto, una questione di particolare

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

importanza è quella relativa ai tempi del recupero e come esso possa essere sostenuto. I soggetti con sopravvivenza oltre i due anni raggiungono un buon livello di QdV, sovrapponibile per certi versi a quello di persone che non si sono ammalate. Le conclusioni indicano che la QdV percepita può essere descritta attraverso una funzione parabolica, con un miglioramento che, a partire dalla dimissione, si prolunga negli anni. L'esperienza di distress varia secondo un funzione lineare e diminuisce con il tempo. Le preoccupazioni circa i vari problemi legati alla malattia variano linearmente con un peggioramento nel tempo.

Nel trapianto di cellule staminali la particolarità del protocollo terapeutico costituisce un elemento centrale del processo terapeutico teso a contrastare la malattia. Una larga parte della letteratura di ricerca clinica considera rilevanti i costrutti di stress, di coping e di QdV, che risultano complessi e con più dimensioni significative.

La QdV del malato va incontro ad un deterioramento significativo a partire dal momento della diagnosi e per un periodo di tempo (di lunghezza variabile) dopo il trapianto. Il malato vive una condizione di crisi e di distress fisico e psicologico: tale condizione di crisi (di identità e di integrità personale) richiede processi di cambiamento e di adattamento. Non esiste un'unica modalità adeguata di coping, ma sono state identificate diverse modalità che si possono strutturare all'interno dei processi di adattamento (ad es. attribuzione di senso e significato alla malattia). Ci sono evidenze per cui la capacità di chiedere aiuto, così come la presenza di un sostegno sociale adeguato, sono fattori di aiuto che si oppongono al senso di impotenza (helplessness) e mancanza di speranza (hopelessness).

Pertanto i risultati degli studi sul distress psicologico, il coping, la QdV, convergono sullo studio dei fattori di rischio e sulle risorse individuali e psicosociali. Ciò costituisce un campo di studio, di particolare significato, volto a identificare i fattori di prevenzione del rischio psicopatologico e alla protezione del benessere psicologico del malato.

In conclusione, l'importanza dello stile di coping in oncologia è legato al fatto che esso si è rivelato uno dei fattori determinanti nel modulare le differenze individuali di reazione psicologica a lungo termine alla malattia e di percezione della qualità della vita.

Risultati e prodotti conseguiti:

Attività previste 1 STUDIO

Valutare lo stile di coping e la percezione del supporto sociale e il modo in cui influiscono sulla qualità di vita e sulla soddisfazione soggettiva in un gruppo di pazienti che hanno subito mastectomia per carcinoma mammario e che si sono sottoposti ad intervento ricostruttivo immediato o differito.

Nell'iter diagnostico una valutazione preliminare delle caratteristiche psicologiche e sociali delle pazienti candidate alla mastoplastica, consentirebbe di individuare alcuni fattori predittivi del grado di soddisfazione soggettiva dopo la ricostruzione, contribuendo così a predisporre adeguati interventi di supporto psicologico nelle pazienti a rischio di outcome sfavorevole.

Disegno dello studio

Studio osservazionale retrospettivo. Le pazienti verranno sottoposte ad un colloquio clinico in cui verrà somministrata un'intervista semistrutturata per la rilevazione dei dati demografici e clinici e ulteriori questionari autosomministrati per la valutazione dello stile di coping, della percezione del supporto sociale e della qualità di vita.

2 STUDIO

Identificare gli effetti a lungo termine del trapianto autologo di cellule staminali sullo stress psicologico e sulla qualità di vita. La valutazione delle caratteristiche psicologiche e sociali dei pazienti candidati a trapianto autologo di cellule staminali, consentirebbe di individuare alcuni fattori predittivi di un positivo adattamento alla condizione di malattia, contribuendo così a predisporre adeguati interventi di supporto psicologico nei pazienti più a rischio di outcome sfavorevole.

Disegno dello studio

Studio osservazionale retrospettivo. I pazienti verranno sottoposti ad un colloquio clinico in cui verrà somministrata un'intervista semistrutturata per la rilevazione dei dati demografici e clinici e ulteriori questionari autosomministrati per la valutazione dello stile di coping, del livello di stress psicologico e della qualità di vita.

8 : Fatigue e carico assistenziale dei familiari caregiver nelle cure di fine vita.

Responsabile: Marmora Angela

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Programma:

Parole chiave:

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2010

Durata: 24

Tipologia: Clinico-Epidemiologica osservazionale

Area di interesse: Terapeutica

Descrizione: Si ipotizza che essere familiare caregiver in cure palliative espone a distress fisico ed emotivo, che può favorire una maggiore vulnerabilità, a sua volta fattore di rischio sia di fatigue che di un peggior stato di salute.

La malattia cancro costituisce un evento con conseguenze fisiche, psicologiche ed emotive, non solo per chi è direttamente colpito, ma anche per chi se ne prende cura.

La diagnosi di cancro implica il coinvolgimento della famiglia che con l'evolvere della malattia è chiamata a sostenere quello che è stato definito il peso della cura (Di Sauro, 2007).

Il caregiver, cioè colui che presta assistenza ad un proprio caro in virtù di un legame affettivo e/o familiare, può risentire negativamente dell'impatto provocato dalla malattia del familiare sulla propria qualità della vita e sul benessere fisico, psicologico e sociale. Numerose ricerche hanno, infatti, focalizzato l'attenzione sulla qualità di vita dei caregiver utilizzando strumenti valutativi e rilevando che questi si trovano a far fronte a distressors fisici, psichici ed ambientali, soprattutto se il paziente è un malato terminale.

La cura dei pazienti affetti da patologia neoplastica può infatti ripercuotersi sul benessere fisico dei caregivers. In particolare alcuni autori segnalano un aumento dell'affaticamento o fatigue (Jensen, 1991; Siegel, 199; Ferrell, 1995).

Carpenito (1996) definisce l'affaticamento come uno stato riconosciuto dalla persona nel quale essa prova un forte e opprimente senso di esaurimento, una diminuita capacità di lavoro fisico e mentale che non sono alleviati dal riposo.

Va sottolineato che l'affaticamento è diverso dalla stanchezza, la quale rappresenta una condizione transitoria, temporanea causata per esempio da mancanza di sonno, nutrizione inappropriata, stile di vita sedentario o aumento momentaneo delle responsabilità lavorative o sociali; contrariamente l'affaticamento è una sensazione pervasiva, soggettiva che non può essere eliminata. In tale ambito è necessario differenziare l'affaticamento cronico dall'affaticamento acuto, quest'ultimo è associabile al termine stanchezza e può essere risolto con il riposo, contrariamente l'affaticamento cronico è caratterizzato da un'implacabile sensazione di esaurimento ed è associato ad altri sintomi quali: debolezza, vertigini, difficoltà di concentrazione, assenza di energia.

L'affaticamento è un sintomo complesso, prevalente nel caregiving informale (coniuge, figlio/a, genitore, più raramente un altro familiare, a volte un amico), soprattutto quando vi è un aumento di compiti e richieste che superano le risorse del caregiver designato. Una corretta e completa comprensione o studio dei fattori che conducono all'affaticamento o fatigue nei gruppi di caregivers può contribuire ad un miglior supporto sia del paziente oncologico che dei caregivers stessi.

Nelle Cure Palliative la presa in carico totale del paziente in fase terminale comporta la presa in carico anche del caregiver, il quale è aggravato oltre che dal peso pratico dell'assistenza anche e soprattutto dal peso emotivo dell'accompagnare una persona cara nella parte ultima della vita. Il prestare e prendersi cura espone infatti a morbidità fisica ed emotiva, difficoltà economiche, distress psicologico quali conseguenze dirette del ruolo di caregiver (Aoun et al., 2005); inoltre la qualità della vita di caregiver di pazienti con tumore prossimi alla morte risulta essere bassa (Weitzner, 1999; Grassi et al., 2003). In letteratura spesso è enfatizzata l'importanza del fornire un sostegno a chi presta cura a pazienti in fase terminale, da parte di personale specializzato nella salute mentale (Gaston-Johannsson et al., 2004; Grov et al., 2005). L'approccio psicologico in cure palliative prevede, quando possibile, un intervento sul paziente finalizzato al sostegno psicologico e all'accettazione e adattamento del periodo di criticità che sta vivendo. Elettivo risulta, invece, l'intervento con il familiare caregiver, al quale deve essere sempre offerto sostegno psicologico, con lo scopo di favorire l'accettazione della malattia e della prognosi.

Bibliografia

 Apolone G., Mosconi P., Quattrococchi L., Granicolo E.A.L., Groth N., Ware E.Jr. Questionario sullo stato di salute SF-12. Versione italiana. Guerrini e Associati Editore, Milano 2001.

 Aoun S.M., Kristjanson L.J., Currow D.C. et al. Caregiving for the terminally ill: at what cost? Palliat Med 2005; 19(7): 551-5.

 Carpenito L. J., Manuale delle diagnosi infermieristiche Ed.italiana a cura di Calamandrei e Daddio. Ed. Sorbona,

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Milano, 1996.

 Di Sauro R., (2007). Principi di psicologia clinica per l'operatore sanitario, Aracne, Roma.

 Gaston-Johannsson F, Lachica EM, Fall-Dickson JM et al. Psychological distress, fatigue, burden of care, and quality of life in primary caregivers of patients with breast cancer undergoing autologous bone marrow transplantation. *Oncol Nurs Forum* 2004; 31 (6): 1161-9.

 Given B., (2004), Burden and depression among caregivers of patients with cancer at the end of life, *Oncology Nursing Forum*, 16, (6).

 Goldstein N.E., (2004), Factors associated with caregiver burden among caregivers of terminally ill patients with cancer, *Journal of Palliative Care*, 20 (1), 38-43.

 Grassi L., Biondi M., Costantini A., *Manuale pratico di psico-oncologia*. Roma, Il Pensiero Scientifico Editore, 2003.

 Jensen, S., Given, B.A., Fatigue affecting family caregivers of cancer patients, *Cancer Nursing* 1991; 14(4):181:187.

 Lowder J.L., Buzney S.J., Buzo A.M., The caregiver balancing act: giving too much or not enough. *Care Manag J* 2005; 6(3): 159-65.

 Rossi Ferrario S., Baiardi P., Zotti A.M., Update on the family strain questionnaire: a tool for the general screening of caregiving-related problems. *Quality of Life Research* (2004) Volume 13, Number 8, 1425-1434.

 Rossi Ferrario S., Cardillo V., Vicario F., Balzarini E., Zotti A.M., (2004), Advanced cancer at home: caregiving and bereavement. *Palliative Medicine*. Mar; 18 (2) :129-36.

 Siegel K., Raveis V.H., Houts P., Mor V., (1991), Caregivers burden and unmet needs, *Cancer*, 68, 11-40.

 Ware J.E., Kosinski M., Keller S.D., (1996), A 12-item short-form health survey: construction of scales and preliminary tests of reliability and validity. *Medical Care*, 34:220-233.

 Webster K., Odom L., Peterman A., Lent L., Cella D., The Functional Assessment of Chronic Illness Therapy (FACIT) measurement system: Validation of version 4 of the core questionnaire. *Qual Life Res* 1999, 8(7):604.

 Weitzner M.A., McMillan S.C., Jacobsen P.B., Family caregiver quality of life: differences between curative and palliative cancer treatment setting. *J Pain Symptom Manage* 1999; 17(6): 418-28.

Risultati e prodotti conseguiti:

Attività previste Valutare la fatigue percepita, lo stato di salute e il sovraccarico assistenziale dei familiari/caregiver che prestano assistenza a pazienti in fase terminale.
Obiettivo secondario: Individuare i familiari più a rischio di distress fisico ed emotivo che necessitano di un supporto psicologico

Linea di ricerca n. 3 : Progetti in Diagnostica per Immagini

1 : Impatto della diagnostica per immagini integrata nel management delle neoplasie solide

Responsabile: Storto Giovanni

Programma:

Parole chiave: neoplasie solide,TC, PET-TC, Radioterapia

Altri enti coinvolti: IBB-CNR

Anno inizio: 2009

Durata: 36

Tipologia: Metodologica

Area di interesse: Diagnostica

Descrizione: L'implementazione nella pratica clinica di nuove strategie terapeutiche specificamente intese per target molecolari è in continuo divenire ed ha già cambiato l'approccio clinico alla malattia neoplastica. Tuttavia, il maggiore challenge per gli oncologi è rappresentato dalla possibilità di valutare l'efficacia e la rilevanza clinica di nuovi farmaci una volta che essi siano stati introdotti in un regime di trattamento. È oltremodo essenziale identificare precocemente, nel corso del trattamento, i pazienti che non rispondano alla chemio- e alla radioterapia, per evitare terapie inefficaci e non dovuti effetti collaterali. Procedure di imaging anatomico come l'ultrasonografia, la CT e la RM sono comunemente usate per seguire nel tempo le

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

dimensioni tumorali e per determinare il grado di risposta. L'assessment morfologico è stato considerato per lungo tempo lo standard nel rilevare la risposta alla terapia in considerazione del fatto che gli agenti citotossici determinano, con la propria attività antitumorale, una riduzione volumetrica della neoplasia.

Attualmente, sono in corso di valutazione nuovi agenti terapeutici che agirebbero mediante meccanismi diversi e comunque non primariamente determinando regressione tumorale. Nella pratica clinica molti oncologi iniziano ad implementare le cosiddette intelligent drugs terapie antitumorali che rendono possibile terapie target-tate e validano il concetto di un approccio terapeutico commisurato ed individualizzato.

In definitiva, la risposta dimensionale potrebbe non essere più il metodo ottimale per valutare il potenziale terapeutico dei nuovi farmaci non-citotossici.

In tale contesto, la PET con F-18 FDG è stata accreditata come un valido presidio diagnostico per la valutazione della risposta al trattamento dei tumori solidi. Numerosi studi, infatti, hanno mostrato che la terapia antineoplastica induce un cambiamento dell'avidità del tumore per FDG e che tale variazione correla con la sopravvivenza dei pazienti.

Alla luce di tali evidenze, si pone stringente la necessità di utilizzare il prezioso ausilio della PET-TC e, validarne i risultati, in due grandi prospettive di ricerca: l'early assessment e la interpretazione dell'imaging, oggettivamente quantificata, nei tumori solidi.

Neoplasie del colon, del polmone e del testa-collo rappresentano, per caratteristiche intrinseche, storia naturale e incidenza, i quadri patologici che meglio si prestano a tale implementazione.

Il cancro del colon rappresenta la quarta neoplasia per incidenza nel mondo (soprattutto nei paesi economicamente più avanzati); come causa di morte occupa il 2° posto dopo il cancro del polmone nei maschi e il 3° posto dopo il cancro mammella e il cancro del polmone nelle femmine. Tra le condizioni predisponenti allo sviluppo di tale neoplasia vanno evidenziati diversi fattori che hanno un peso specifico differente. Tra essi le sindromi ereditarie. La lesione molecolare responsabile è dovuta ad una mutazione genica. Nella genesi del cancro del colon-retto sono implicati proto-oncogeni (K-ras, c-myc, Src), geni oncosoppressori (APC, p53) e riparatori del DNA. I fattori dietetici giocano un ruolo cruciale nella predisposizione alla insorgenza della neoplasia. In questi anni si sono moltiplicati i fattori che sembrano influenzare la prognosi del cancro del colon-retto: il maggiore rimane lo stadio della malattia, a seguire altri fattori quali l'aspetto della crescita tumorale sul margine di invasione (espansivo e/o infiltrativo), il grado di infiltrazione linfocitaria peritumorale, il tipo di neoplasia, il grading, le caratteristiche biomolecolari, il tipo e numero di mutazioni cromosomiche.

Le neoplasie polmonari, pongono frequentemente cruciali quesiti diagnostici come la loro aggradibilità. L'integrazione di imaging funzionale e biomolecolare nei piani di trattamento e nella valutazione della risposta alla radioterapia rappresenterebbe un valore aggiunto al corretto management del paziente. Nel nostro Istituto i Servizi di Medicina Nucleare e Radioterapia appartengono allo stesso dipartimento consentendo, anche logicamente, la congrua coordinazione delle procedure.

Anche per i tumori del testa-collo è valido quanto sopra descritto.

Negli ultimi anni si è intensificato l'uso dell'imaging funzionale in radioterapia grazie all'introduzione della PET nel trattamento di molte forme neoplastiche. Finora il target della Radioterapia, ossia la malattia tumorale, veniva considerato omogeneo, quindi si somministrava una dose omogenea di radiazioni ionizzanti. Oggi, invece, grazie all'utilizzo dell'imaging funzionale, è possibile prendere in considerazione il volume biologico (BTV) e non solo il volume tumorale macroscopico (GTV) o sub clinico (CTV). L'introduzione del BTV permette di essere più selettivi e più efficaci. Disporre di informazioni funzionali significa identificare le aree dove la malattia è più aggressiva e, quindi, poter optare per tecniche di dose-escalation cioè di intensificazione della dose, o di concomitant boost (un sovra-dosaggio durante il trattamento stesso sulla parte del tumore più aggressiva, in modo da ottenere un maggior controllo locale della malattia), o ancora per un ipofrazionamento della dose (ad esempio, per trattamenti radiochirurgici, è possibile erogare una dose maggiore per seduta, riducendo il numero totale delle sedute). Tutto questo migliora non solo l'efficacia del trattamento ma anche la qualità di vita del paziente, diminuendo la tossicità e i tempi di esecuzione delle terapie.

L'evoluzione della Radioterapia verso i trattamenti ad intensità modulata (IMRT) e verso la Radiochirurgia può trarre enormi vantaggi dalle informazioni della PET soprattutto per quanto riguarda l'identificazione di aree a diverso comportamento biologico nell'ambito della stessa massa tumorale (es. aree di ipossia) e per quando riguarda l'irradiazione ad alte dosi di piccoli volumi con estrema accuratezza e precisione.

In tale contesto appare evidente come un ruolo preminente possa essere giocato da procedure strumentali che siano in grado di valutare l'aspetto morfologico e funzionale allo stesso tempo sia della neoplasia che degli organi da essa interessati. Inoltre, tali procedure si pongono come diretti nell'assessment in corso d'opera, durante terapia. Le strategie clinico-diagnostiche e terapeutiche in oncologia sono finora state pressoché esclusivamente incentrate sulle informazioni ottenibili dall'imaging morfologico. La pianificazione di adeguati interventi terapeutici deve essere supportata dal riscontro oggettivo di una alterazione morfologica, tuttavia tale approccio si è avvalso recentemente dell'implementazione di metodiche di imaging più prettamente funzionali basate sulla utilizzazione di indicatori metabolici e/o di alterata crescita cellulare nonché sulla integrazione dei dati così ottenuti con quelli morfologici. I limiti di un approccio esclusivamente anatomico risiedono fondamentalmente nella mancata caratterizzazione delle specifiche funzionali e/o molecolari del tumore.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Le convenzionali metodiche diagnostiche influenzano la definizione del parametro T in misura determinante, tuttavia l'integrazione delle informazioni da esse fornite con peculiarità metaboliche parametrabili della neoplasia potrebbe consentirne una caratterizzazione bio-molecolare.

A tale scopo presso il nostro Istituto, è in corso l'applicazione di criteri semi-oggettivi di interpretazione dell'imaging morfo-funzionale allo scopo di migliorare qualità e riproducibilità nella diagnosi. Infatti, l'applicazione dei nuovi criteri RECIST, dei nuovi criteri PRECIST, e l'applicazione dei criteri EORTC nell'assessment dei tumori solidi e della loro risposta alla terapia sembra supportare tale evidenza.

In tale intricato scenario la PET-TC grazie alle insite potenzialità (strumentazioni altamente performanti, radiotraccianti altamente specifici, possibilità di caratterizzazione biomolecolare e di fusione delle immagini), può rivelarsi una metodica di riferimento grazie anche alla possibilità di una facile integrazione negli algoritmi diagnostici.

Risultati e prodotti conseguiti: L'attività scientifica correlata alla linea di ricerca in oggetto (diagnostica per immagini integrata) si è prevalentemente svolta, nel corso dell'anno 2009 con appendici nei primi mesi del 2010, nell'ambito di studi autonomi e di collaborazione con altri Istituti con particolare riferimento alla valutazione dell'imaging metabolico nelle neoplasie e nella valutazione degli effetti delle terapie.

In particolare, gli studi ongoing hanno previsto l'implementazione di criteri quali-quantitativi (IWC; IWC+PET, EORTC) per le emopatie linfoproliferative ed una valutazione oggettivamente codificata (Nuovi criteri RECIST, criteri PERCIST, applicazione criteri EORTC) per le neoplasie solide. L'applicazione sistematica di tali metodologie interpretative nella pratica clinica consente una dettagliata e riproducibile valutazione delle immagini, quantitativamente supportata, con conseguente miglioramento delle strategie diagnostiche e terapeutiche. A tal fine sono state redatte procedure operative standard, anche interpretative, applicabili da qualsivoglia operatore lo ritenga necessario. Tale standardizzazione, non mera applicazione di criteri, ha trovato routinaria attuazione, ha consentito e consente una migliore gestione dei dati ed ha contribuito all'ottenimento dell'accreditamento ISO 9001:2008 dell'Unità Operativa.

Sono stati conclusi alcuni studi. In particolare, è stato valutato l'impatto della metodologia FDG PET/TC (tomografia ad emissione di positroni) nella valutazione morfo-funzionale degli effetti della radioimmunoterapia (RIT) con anticorpo monoclonale anti-CD20 radiomarcato (90Y ibritumumab tiuxetan; Zevalin) in pazienti con linfoma Non-Hodgkin refrattari alle convenzionali terapie o in ricaduta. Un manoscritto su tale topic sarà pubblicato nel 2010.

Un ulteriore manoscritto sul ruolo della PET/TC nella valutazione della attività metabolica delle lesioni di pazienti affetti da linfoma a cellule T è in corso di sottomissione ad una rivista ematologica.

I pazienti affetti da carcinoma differenziato della tiroide già sottoposti a chirurgia ed ablazione radionuclidica del residuo tiroideo rappresentano, per i clinici, un challenge particolarissimo qualora, nel corso del follow up, vi sia il riscontro incidentale di alti valori tireoglobulinici ed il fondato sospetto di recidiva loco regionale. I lavori pubblicati continuano ad evidenziare il ruolo cruciale della metodologia PET/TC nella implementazione di ulteriori strategie terapeutiche, anche di tipo radiometabolico, in tali pazienti, e la fondata necessità di introdurre tali procedure medico-nucleari nell'algoritmo diagnostico di tali neoplasie. In tale contesto, inoltre, è in corso di rivisitazione ed oggetto di studio l'indicazione alla terapia ablativa con radioiodio nei pazienti affetti da carcinoma differenziato della tiroide a basso rischio (diametro < 1 cm). Recenti revisioni della letteratura e di linee guida (vedi Revised American Thyroid Association Management, Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer) confermano la non indicazione a trattare con radioiodio tale subset di pazienti. Tuttavia, in uno studio retrospettivo in corso, ricorre frequente evidenza di un interessamento metastatico delle stazioni linfonodali loco-regionali, pur in presenza di lesioni primitive minime. La sistematica implementazione della metodologia SPECT-TC, in tale subset di pazienti, ha contribuito a rilevare il coinvolgimento linfonodale occulto. Tale approccio potrebbe indurre al recupero di una quota di pazienti che avrebbero altrimenti interrotto il proprio algoritmo terapeutico con la chirurgia. I dati raccolti sono attualmente in fase di valutazione e vengono correlati ad indici prognostici.

Per quanto concerne gli studi ongoing, un particolare cenno merita la valutazione precoce morfo-funzionale mediante PET/TC con FDG delle recidive nei pazienti già sottoposti a resezione di neoplasia del colon-retto. La valutazione delle immagini PET/TC per l'early assessment ha permesso di identificare in 28 pazienti una recidiva di neoplasia nella sede dell'intervento e/o in prossimità di essa (lesioni linfonodali e non). Le immagini integrate morfo-funzionali della PET/TC si sono rivelate sensibilmente più accurate delle sole immagini TC nella identificazione delle recidive. Inoltre, la valutazione semiquantitativa (SUV) si è rivelata un utile supporto ed il suo impatto è in corso di valutazione anche in relazione ad indici prognostici. La individuazione di un cut-off quantitativo sembra poter essere utile nella stratificazione prognostica di pazienti che presentino unexplained rise dei marcatori tumorali dopo resezione colica.

È stata pubblicata una review sull'early assessment nei tumori solidi. In tale generale contesto, ed in particolare nel succitato studio, è in corso l'applicazione, presso il nostro Istituto, dei criteri semi-oggettivi di interpretazione dell'imaging morfo-funzionale allo scopo di migliorare qualità e riproducibilità nella diagnosi. Infatti, l'applicazione dei nuovi criteri RECIST, dei nuovi criteri PERCIST, e l'applicazione dei criteri EORTC nell'assessment dei tumori solidi e della loro

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

risposta alla terapia sembra supportare tale evidenza.

Infine, è in corso di valutazione/implementazione di una terapia palliativa precoce del dolore da metastasi ossee in pazienti affetti da neoplasie mammarie e/o della prostata metastatiche che presentino una alta soglia del dolore. Tale argomento è oggetto di un manoscritto in corso di preparazione e su tale argomento un componente dell'Unità di Medicina Nucleare ha redatto un capitolo di un libro di recente pubblicato dalla Springer ed è stato invitato a partecipare ad una Survey multicentrica

Le neoplasie polmonari, pongono frequentemente cruciali quesiti diagnostici come la loro aggreddibilità. L'integrazione di imaging funzionale e biomolecolare nei piani di trattamento e nella valutazione della risposta alla radioterapia rappresenterebbe un valore aggiunto al corretto management del paziente. Nel nostro Istituto i Servizi di Medicina Nucleare e Radioterapia appartengono allo stesso Dipartimento consentendo, anche logisticamente, la congrua coordinazione delle procedure. Anche per i tumori del testa-collo è valido quanto sopra descritto. Sono in corso studi per l'applicazione integrata di protocolli comunemente condivisi, soprattutto per quanto riguarda l'identificazione di aree a diverso comportamento biologico nell'ambito della stessa massa tumorale (es. aree di ipossia) e per quando riguarda l'irradiazione ad alte dosi di piccoli volumi con estrema accuratezza e precisione.

Studi preliminari sono stati condotti a termine, sempre in collaborazione con altri Istituti (Università Federico II e Istituto di Biostrutture e Bioimmagini del CNR di Napoli) sullo studio della riserva coronarica. In campo oncologico, un incremento del rischio di mortalità cardiovascolare è stato ripetutamente riscontrato in pazienti affette da cancro della mammella sinistra sottoposte a terapia radiante sul torace. Il rationale fisiopatologico risiede verosimilmente nel danno indotto a livello cellulare sul miocardio o probabilmente nel danno al circolo ed al microcircolo coronario. L'attuazione di procedure medico-nucleari come la SPECT miocardica di perfusione e lo studio semi-quantitativo della riserva coronarica hanno consentito di rilevare, in tali pazienti, la presenza di una percentuale maggiore di deficit della perfusione nonché la detezione di alterazioni della riserva coronarica prima che qualsivoglia alterazione morfologica abbia avuto luogo. Tale aspetto, è stato ulteriormente approfondito anche dal punto di vista metodologico nel nostro Istituto, ed è stato oggetto di pubblicazione.

Aggiornamento 2010

Nell'ambito di studi autonomi e di collaborazione con altri Istituti con particolare riferimento alla valutazione dell'imaging metabolico nelle neoplasie e nella valutazione degli effetti delle terapie.

In particolare, gli studi ongoing hanno previsto l'implementazione di criteri quali-quantitativi (IWC; IWC+PET, EORTC) per le emopatie linfoproliferative ed una valutazione oggettivamente codificata (Nuovi criteri RECIST, criteri PERCIST, applicazione criteri EORTC) per le neoplasie solide. Applicazione sistematica di tali metodologie interpretative nella pratica clinica consente una dettagliata e riproducibile valutazione delle immagini, quantitativamente supportata, con conseguente miglioramento delle strategie diagnostiche e terapeutiche. A tal fine sono state redatte procedure operative standard, anche interpretative, applicabili da qualsivoglia operatore lo ritenga necessario. Tale standardizzazione, non mera applicazione di criteri, ha trovato routinaria attuazione, ha consentito e consente una migliore gestione dei dati ed ha contribuito all'ottenimento dell'accreditamento ISO 9001:2008 dell'Unità Operativa.

Sono stati conclusi alcuni studi. In particolare, è stato valutato l'impatto della metodologia FDG PET/TC (tomografia ad emissione di positroni) nella valutazione morfo-funzionale degli effetti della radioimmunoterapia (RIT) con anticorpo monoclonale anti-CD20 radiomarcato (90Y ibritumumab tiuxetan; Zevalin) in pazienti con linfoma Non-Hodgkin refrattari alle convenzionali terapie o in ricaduta. Un manoscritto su tale topic sarà pubblicato nel 2010.

Un ulteriore manoscritto sul ruolo della PET/TC nella valutazione della attività metabolica delle lesioni di pazienti affetti da linfoma a cellule T è in corso di sottomissione ad una rivista ematologica.

I pazienti affetti da carcinoma differenziato della tiroide già sottoposti a chirurgia ed ablazione radionuclidica del residuo tiroideo rappresentano, per i clinici, un challenge particolarissimo qualora, nel corso del follow up, vi sia il riscontro incidentale di alti valori tireoglobulinici ed il fondato sospetto di recidiva loco regionale. I lavori pubblicati continuano ad evidenziare il ruolo cruciale della metodologia PET/TC nella implementazione di ulteriori strategie terapeutiche, anche di tipo radiometabolico, in tali pazienti, e la fondata necessità di introdurre tali procedure medico-nucleari nell'algoritmo diagnostico di tali neoplasie. In tale contesto, inoltre, è in corso di rivisitazione ed oggetto di studio l'indicazione alla terapia ablativa con radioiodio nei pazienti affetti da carcinoma differenziato della tiroide a basso rischio (diametro < 1 cm). Recenti revisioni della letteratura e di linee guida (vedi Revised American Thyroid Association Management, Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer) confermano la non indicazione a trattare con radioiodio tale subset di pazienti. Tuttavia, in uno studio retrospettivo in corso, ricorre frequente evidenza di un interessamento metastatico delle stazioni linfonodali loco-regionali, pur in presenza di lesioni primitive minime. La sistematica implementazione della metodologia SPECT-TC, in tale subset di pazienti, ha contribuito a detettare il coinvolgimento linfonodale occulto. Tale approccio potrebbe indurre al recupero di una quota di pazienti che avrebbero altrimenti interrotto il proprio algoritmo terapeutico con la chirurgia. I dati raccolti sono attualmente in fase di valutazione e vengono

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

correlati ad indici prognostici.

Per quanto concerne gli studi ongoing, un particolare cenno merita la valutazione precoce morfo-funzionale mediante PET/TC con FDG delle recidive nei pazienti già sottoposti a resezione di neoplasia del colon-retto. La valutazione delle immagini PET/TC per l'early assessment ha permesso di identificare in 28 pazienti una recidiva di neoplasia nella sede dell'intervento e/o in prossimità di essa (lesioni linfonodali e non). Le immagini integrate morfo-funzionali della PET/TC si sono rivelate sensibilmente più accurate delle sole immagini TC nella identificazione delle recidive. Inoltre, la valutazione semiquantitativa (SUV) si è rivelata un utile supporto ed il suo impatto è in corso di valutazione anche in relazione ad indici prognostici. La individuazione di un cut-off quantitativo sembra poter essere utile nella stratificazione prognostica di pazienti che presentino unexplained rise dei marcatori tumorali dopo resezione colica.

È stata pubblicata una review sull'early assessment nei tumori solidi. In tale generale contesto, ed in particolare nel succitato studio, è in corso l'applicazione, presso il nostro Istituto, dei criteri semi-oggettivi di interpretazione dell'imaging morfo-funzionale allo scopo di migliorare qualità e riproducibilità nella diagnosi. Infatti, l'applicazione dei nuovi criteri RECIST, dei nuovi criteri PERCIST, e l'applicazione dei criteri EORTC nell'assessment dei tumori solidi e della loro risposta alla terapia sembra supportare tale evidenza.

Infine, è in corso di valutazione l'implementazione di una terapia palliativa precoce del dolore da metastasi ossee in pazienti affetti da neoplasie mammarie e/o della prostata metastatiche che presentino una alta soglia del dolore. Tale argomento è oggetto di un manoscritto in corso di preparazione e su tale argomento un componente dell'Unità di Medicina Nucleare ha redatto un capitolo di un libro di recente pubblicato dalla Springer ed è stato invitato a partecipare ad una Survey multicentrica

Le neoplasie polmonari, pongono frequentemente cruciali quesiti diagnostici come la loro aggradibilità. L'integrazione di imaging funzionale e biomolecolare nei piani di trattamento e nella valutazione della risposta alla radioterapia rappresenterebbe un valore aggiunto al corretto management del paziente. Nel nostro Istituto i Servizi di Medicina Nucleare e Radioterapia appartengono allo stesso Dipartimento consentendo, anche logisticamente, la congrua coordinazione delle procedure. Anche per i tumori del testa-collo è valido quanto sopra descritto. Sono in corso studi per l'applicazione integrata di protocolli comunemente condivisi, soprattutto per quanto riguarda l'identificazione di aree a diverso comportamento biologico nell'ambito della stessa massa tumorale (es. aree di ipossia) e per quando riguarda l'irradiazione ad alte dosi di piccoli volumi con estrema accuratezza e precisione.

Studi preliminari sono stati condotti a termine, sempre in collaborazione con altri Istituti (Università Federico II e Istituto di Biostrutture e Bioimmagini del CNR di Napoli) sullo studio della riserva coronarica. In campo oncologico, un incremento del rischio di mortalità cardiovascolare è stato ripetutamente riscontrato in pazienti affette da cancro della mammella sinistra sottoposte a terapia radiante sul torace. Il rationale fisiopatologico risiede verosimilmente nel danno indotto a livello cellulare sul miocardio o probabilmente nel danno al circolo ed al microcircolo coronario. L'attuazione di procedure medico-nucleari come la SPECT miocardica di perfusione e lo studio semi-quantitativo della riserva coronarica hanno consentito di rilevare, in tali pazienti, la presenza di una percentuale maggiore di deficit della perfusione nonché la detezione di alterazioni della riserva coronarica prima che qualsivoglia alterazione morfologica abbia avuto luogo. Tale aspetto, è stato ulteriormente approfondito anche dal punto di vista metodologico nel nostro Istituto, ed è stato oggetto di pubblicazione.

Sono state intervistate 40 donne affette da tumore mammario, 10 donne con carcinoma dell'endometrio, 6 con tumore della cervice, 8 con tumore allovero.

Sono stati somministrati 10 questionari a donne affette da tumori diversi da quelli della sfera sessuale.

Letà complessiva varia da 30-74 anni di età (media 45 anni).

Le difficoltà relative alla sessualità e alla funzione sessuale ed i problemi relativi all'immagine corporea sono stati sperimentati da un nutrito gruppo di donne e si sono verificati non solo precocemente dopo il trattamento chirurgico o chemioterapico adiuvante, ma anche a distanza di tempo.

Oltre la metà (60 donne) ha provato 1 o più problemi di immagine corporea che rappresenta il principale motivo di danno alla qualità della vita sessuale. La maggior parte di questi problemi si associa alla mastectomia, alla presenza di stomia cutanea e alle cicatrici chirurgiche, infatti queste donne si percepiscono meno attraenti nel 38% e mutilate nel 34%.

A questi problemi si associano anche sentimenti di paura nel 45%, tristezza (37%), stress (33%), bassa autostima (7%), senso di colpa (7%) e timore soprattutto degli effetti collaterali delle terapie (56%) e delle mutilazioni.

Un numero significativo di pazienti (80%) si è dichiarato soddisfatto della propria vita sessuale e della relazione con il partner prima della malattia, soddisfazione complessivamente ridotta dopo la malattia ed i trattamenti (50%).

Tra le donne sessualmente attive (95%), circa la metà ha riferito un problema in due o più aree della funzione sessuale dopo la malattia, con incremento della quota che non ha più nessuna attività sessuale, calo del desiderio, eccitazione e lubrificazione assente o molto bassa e orgasmo sperimentato raramente, verbalmente alcune donne hanno imputato il decadimento della loro relazione affettiva e sessuale alla mancanza di desiderio e iniziativa del partner o alle sue difficoltà sessuali.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

I maggiori problemi sessuali femminili erano associati a turbe menopausali, quali vampate / sudorazioni (80 %) e secchezza vaginale (36 %), a dispareunia (44%), a disturbi urinari ((35 %), a problemi di immagine corporea (60%) e a malessere psicologico.

Le risposte ai questionari somministrati alle donne con tumori non ginecologici e non mammari non sono ancora pervenute.
Pubblicazioni

Nardelli A., Castaldi E., Ortosecco G., Speranza A., Storto G., Pace L., Salvatore M.

Enhancement of reaction conditions for the radiolabelling of DOTA-peptides with high activities of yttrium-90 Appl. Radiat. Isotopes, 2010

IF: 1.094

Storto G., Di Giorgio E., De Renzo A., Micol L., Cerciello G., Nardelli A., Capacchione D., Elena Castaldi E., Ortosecco G., Pace L. Assessment of metabolic activity by PET-CT with F-18-FDG in patients with T-cell lymphoma. British Journal of Haematology, 2010.

IF: 4.597

S. Cicala; T. Pellegrino; G. Storto; M.G. Caprio; R. Paladini; C. Mainolfi; F. de Leva; A. Cuocolo. Noninvasive quantification of coronary endothelial function by SPECT imaging in children with history of Kawasaki disease. EJNMMI 2010

IF: 4.531

Storto G, De Renzo A, Pellegrino T, Perna F, De Falco T, Erra P, Nardelli A, Speranza A, Klain M, Rotoli B, Pace L. Assessment of Metabolic Response to Radioimmunotherapy with Yttrium-90 Ibritumomab Tiuxetan in Patients with Relapsed or Refractory B-cell non-Hodgkin Lymphoma. Radiology 2010 Jan;254(1):245-52.

IF: 6.341

Attività previste Il progetto si articolerà in tre direttive. La prima prevede un ulteriore reclutamento dei pazienti già sottoposti a resezione rettocolica con sospetta recidiva biologica. La seconda l'arruolamento di pazienti da sottoporre a piani di trattamento radioterapico per Ca del polmone e del testa-collo. La terza, che comprende ed integra le precedenti, prevede l'attuazione di codificati criteri interpretativi. È in corso di valutazione l'acquisizione di una strumentazione di lettura codificata che permetta links a scopo multicentrico

2 : Innovazioni tecnologiche per lottimizzazione del trattamento radioterapico

Responsabile: Fusco Vincenzo

Programma:

Parole chiave: IMRT, IGRT, Dosimetria in Vivo, Adaptive Radiotherapy, Imaging Funzionale

Altri enti coinvolti: UCSC Roma e UCSC Campobasso

Anno inizio: 2009

Durata: 36

Tipologia: Metodologica

Area di interesse: Terapeutica

Descrizione: Accanto alle tecniche di radioterapia conformazionale 3D CRT, tecniche di irraggiamento con fasci ad intensità modulata IMRT hanno avuto, in questi ultimi anni, un'enorme sviluppo. La IMRT rappresenta una delle più avanzate e promettenti tecniche di radioterapia oncologica. La possibilità di conformare il rilascio di dose terapeutica alla geometria, anche molto complessa, di una massa tumorale consente di salvaguardare in modo ottimale i tessuti sani adiacenti al tumore (OAR), riducendo quindi la possibilità di complicanze e aumentando la possibilità di riuscita del trattamento. Partendo da un contesto generale di incremento auspicabile di pazienti con malattie in stadio non avanzato grazie all'introduzione di nuovi strumenti diagnostici, i

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

test genetici e di screening a larga scala;

sviluppo di nuove modalità biologiche (genetica, proteomica, profili molecolari, immunologia) di selezione dei pazienti e delle modalità di trattamento.

Riveste di grande interesse e maggiore significatività il tentativo di sviluppare tecniche di delivery in grado di erogare dosi sempre più elevate al tumore aumentando il controllo loco regionale della malattia e potenzialmente la percentuale di sopravvivenza con possibilità di riduzione delle complicanze e delle tossicità ai tessuti sani. È proprio nell'ottica di aumentare la finestra terapeutica delle curve dose-risposta fra tumore e OAR, che si inquadrano:

lo sviluppo di tecniche di imaging sempre più sensibili per la definizione dei volumi di interesse;

lo sviluppo di tecniche di delivery con maggiori gradi di libertà nell'erogazione;

lo sviluppo di Image Guided/Tracking in grado di controllare il posizionamento del paziente ed eventuali movimenti d'organo durante il trattamento.

Relativamente all'imaging, gli sviluppi tendono ad essere rivolti all'utilizzo di tecniche sempre più specifiche in grado di migliorare la qualità delle immagini, individuare l'effettiva estensione della malattia e ridurre l'incertezza legata al movimento degli organi nella definizione della stessa. In tale contesto si assiste allo sviluppo e alla coregistrazione di tecniche di imaging anatomico (CT, NMR) e funzionale (SPECT, PET, PET/CT). Da qui, la definizione non solo di volumi clinici (CTV) ma anche di volumi biologici (PTV). Relativamente alle tecniche di delivery, si osserva come lo sviluppo tecnologico possa essere fondamentalmente guidato da tre obiettivi:

avere tecniche di delivery in grado di ottenere gradienti di dose sempre più elevati (tecniche IMAT vs tecniche IMRT non rotazionali);

con un numero maggiore beamlet in modo da migliorare il processo di ottimizzazione (si pensi all'introduzione di mini collimatori multilamellari, a tecniche ad arco, a tecniche ad irradiazione elicoidale);

con un numero sempre maggiore di gradi di libertà.

Infine gli sviluppi tecnologici sono rivolti all'introduzione di tecniche di image guided in grado di controllare sia le possibili incertezze di set-up che i possibili movimenti di organi. Si assiste al passaggio dall'utilizzo di immagini planari, film a quello di immagini biplanari o 3D: immagini kVCT (CBCT); all'utilizzo degli EPID (Electronic Portal Image Device) come sistemi di dosimetria in vivo per un controllo rapido e periodico della dose erogata al paziente.

Contemporaneamente allo sviluppo di tecniche per il controllo e la riduzione del set-up del paziente si stanno sviluppando tecniche per il controllo e la riduzione del movimento degli organi: gating dell'irradiazione e/o del respiro.

Risultati e prodotti Nel progetto di ricerca presentato sono in corso di sviluppo i seguenti punti:

conseguiti:

1. Metodiche di radioterapia guidata mediate dalla dosimetria in vivo e sistemi EPID come dosimetri di transito
2. Rivalutazione della distribuzione di dose (adaptive radiotherapy) per migliorare l'accuratezza del trattamento radiante.
3. L'Imaging per la radioterapia: 4D PET e MRI.

Per quanto concerne il primo punto, si stanno realizzando misure dosimetriche di caratterizzazione del fascio del nostro acceleratore lineare al fine di calibrare l'EPID e consentire la gestione di un software in grado di ricavare in automatico la dose all'isocentro processando l'immagine integrale acquisita durante l'erogazione. L'utilizzo dell'EPID consentirà di interpretare l'immagine portale anche come immagine di dose trasmessa e quindi con un contenuto di informazioni che non riguarda solo i distretti anatomici attraversati dal fascio di fotoni ma anche la dose assorbita dai tessuti irradiati. Tale lavoro si sta svolgendo anche in collaborazione con l'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma.

Per quanto concerne il secondo punto è stata sviluppata una procedura di valutazione dell'accuratezza dei trattamenti radianti mediante il dispositivo EPID. Allo scopo sono stati selezionati alcuni pazienti affetti da carcinoma polmonare. Tale metodica permette di determinare e stimare gli errori di set-up e quelli legati all'organ motion sfruttando una particolare modalità di acquisizione (cine mode acquisition). Nello specifico l'EPID viene utilizzato per raccogliere la radiazione in uscita e produrre una sequenza di immagini per ogni campo di trattamento attraverso le quali è possibile localizzare e seguire la lesione polmonare durante il trattamento valutandone l'adeguatezza dei margini definiti nella fase di pianificazione. Un lavoro preliminare (case report) è stato già sottomesso per pubblicazione.

Inoltre è stato standardizzato un metodo per la valutazione dei cambiamenti morfologici o errori di set-up utilizzando il segnale trasmesso dai pazienti acquisito con una camera a ionizzazione. È stato selezionato un numero statisticamente significativo di pazienti con carcinoma polmonare. Al momento il metodo si è rivelato utile allo scopo, ha evidenziato infatti nei casi già analizzati l'effettiva riduzione o non della massa tumorale durante il trattamento. Un caso particolarmente interessante è stato analizzato e già sottomesso come case report alla rivista Tumori per pubblicazione. In seguito alla rivelazione di una alterazione del segnale trasmesso è stata programmata una nuova indagine TC che ha permesso di rivalutare il piano e rielaborarne uno adattivo, senza grande carico di lavoro e nessuna dose aggiuntiva al paziente. Con l'arrivo delle nuove tecnologie di IGRT, gating respiratorio, Cone Beam, RapidArc acquisite dalla U.O. di Radioterapia queste metodiche verranno integrate con i sistemi forniti dalle ditte.

Per quanto riguarda il terzo punto, è stata installata la Risonanza magnetica a 3T e sono in corso di realizzazione i lavori

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

per l'installazione della CT-PET.

È stato infine, pubblicata una esperienza multicentrica sulla dose di 8GY, in singola somministrazione radioterapica per il trattamento delle compressioni spinali metastatiche, nell'ambito di uno studio nazionale randomizzato, multicentrico, di Fase III.

Aggiornamento 2010 ,

Nel progetto di ricerca presentato sono elencati i seguenti punti come linee da sviluppare:

1. Sviluppo di nuovi Metodi di calcolo e controllo Dosimetrico in vivo della Radioterapia del tumore Polmonare in grado di controllare l'esatta erogazione della dose e di valutare cambiamenti morfologici di malattia durante il trattamento.
 2. Sviluppo di metodiche di Image Guided/Tracking in grado di controllare il posizionamento del di valutare eventuali movimenti d'organo durante il trattamento (Cone Beam CT, Gating Respiratorio)
 3. Sviluppo di tecniche di delivery con maggiori gradi di libertà nell'erogazione (IMRT, Terapie ad arco, IMAT)
 4. Sviluppo di tecniche di imaging sempre più sensibili per la definizione dei volumi di interesse (RNM, CT, CT-PET)
- Per quanto concerne il primo punto, abbiamo introdotto il nuovo metodo di dosimetria in vivo più veloce ed efficace realizzando le misure di calibrazione dell'EPID come dosimetro ed implementando un software in grado di ricavare in automatico la dose all'isocentro processando l'immagine integrale acquisita durante l'erogazione. L'utilizzo dell'EPID consente infatti di interpretare l'immagine portale anche come immagine di dose trasmessa e quindi con un contenuto di informazioni che non riguarda solo i distretti anatomici attraversati dal fascio di fotoni ma anche la dose assorbita dai tessuti irradiati. È in via di sviluppo il monitoraggio dosimetrico dei pazienti affetti da tumore polmonare basato sulle nuove funzioni di correlazione generalizzate al fine di testarne la validità e applicarlo alla pratica clinica. È in corso una collaborazione con la UCSC con lo scopo di studiare e quantificare le differenze nel calcolo della distribuzione di dose utilizzando differenti algoritmi e correlare i parametri dosimetrici con il planning target volume (PTV). Gli algoritmi di calcolo della dose giocano un ruolo cruciale nei moderni TPS soprattutto nei trattamenti nella regione toracica dove la disomogeneità di tessuto presentano una particolare sfida. In questo studio si stanno studiando le differenze nella distribuzione di dose per casi clinici di tumori polmonari utilizzando algoritmi di calcolo della dose Pencil Beam Convolution (PBC) e Anisotropic Analytic Algorithm (AAA) dell'Eclipse Varian. L'obiettivo è ottimizzare il trattamento radioterapico al polmone per il quale gli algoritmi tradizionali, sovrastimando la dose al target, possono ottenere/determinare una terapia meno efficace.
- Le informazioni fornite dalla dosimetria in vivo tramite EPID verranno presto integrate con le nuove tecnologie in via di implementazione presso la nostra U.O. di Radioterapia (Cone Beam CB-CT, IMRT, IGRT, gating respiratorio, etc.).
- Per quanto riguarda il secondo punto, la conoscenza in tempo reale dell'anatomia della regione trattata durante la somministrazione dell'irradiazione, mediante l'utilizzo della Cone Beam CT renderà possibili interventi adattativi nel corso del trattamento, in relazione al riscontro giornaliero di eventuali modificazioni della lesione neoplastica quali conseguenza di risposta al trattamento.
- La possibilità di localizzare il target con precisione e di riconformare la dose tenendo conto delle modificazioni interfrazione e intrafrazione che intervengono nel corso del trattamento consentirà di ottenere:
- dose escalation sui volumi tumorali e risparmio dei tessuti sani;
 - miglior controllo loco-regionale della malattia e riduzione della tossicità della cura;
 - implementazione di schemi di ipofrazionamento e quindi positive ricadute in termini di abbattimento delle liste di attesa e riduzione dei disagi ai pazienti.

Per quanto riguarda il terzo punto con l'implementazione del nuovo acceleratore il Trilogy della VARIAN nella U.O. di radioterapia sarà possibile erogare trattamenti super specialistici tra cui IMRT, le Terapie ad arco, IMAT che consentiranno di progettare nuovi studi clinici.

Per quanto riguarda l'ultimo punto si vuole utilizzare la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (MRS) per caratterizzare i profili metabolici e ottenere informazioni sui metaboliti che definiscono e differenziano i diversi stati fisiologici e patologici. È possibile quindi identificare per le diverse patologie metaboliti specifici (biomarcatori) che possano formare un panel di biomarcatori da utilizzare nella differenziazione degli stati fisiopatologici. Allo scopo saranno esaminati gli spettri ottenuti mediante spettrometria MRS in vivo, operante a 3 T, dagli stessi pazienti affetti dai tumori oggetto di studio. In particolare si studieranno le patologie cerebrali allo scopo di valutare gli effetti di trattamenti radioterapici concomitanti alla chemioterapia.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Parallelamente a tale attività la nostra partecipazione a convegni nazionali ed internazionali è stata caratterizzata anche da presentazioni e contributi scientifici con la relativa pubblicazione sugli Atti.

Attività previste Nell'ottica di proseguimento del lavoro già svolto nel corso di quest'anno si propone un progetto in cui si evidenziano i seguenti punti da sviluppare:

1. Metodiche di radioterapia guidata mediante la dosimetria in vivo e sistemi EPID come dosimetri di transito
2. Rivalutazione della distribuzione di dose (adaptive radiotherapy) per migliorare l'accuratezza del trattamento radiante.
3. L'imaging per la radioterapia: 4D PET e MRI

Il lavoro già svolto ha messo in evidenza come la dosimetria in vivo sia uno strumento indispensabile da affiancare alle moderne tecnologie di imaging per il controllo dei cambiamenti morfologici e del movimento d'organo. L'utilizzo di EPID consentirà di interpretare l'immagine portale anche come immagine di dose trasmessa e quindi con un contenuto di informazioni che non riguarda solo i distretti anatomici attraversati dal fascio di fotoni ma anche la dose assorbita dai tessuti irradiati. Poiché i dispositivi per immagini portali hanno caratteristiche proprie per efficienza di rivelazione, linearità, rapporto segnale-rumore e risoluzione, sarà preliminarmente realizzata la calibrazione dell'EPID e la programmazione di un software che consenta di ricavare in automatico la dose all'isocentro processando l'immagine integrale acquisita dall'EPID durante l'erogazione del fascio. L'obiettivo che si vuole conseguire con l'acquisizione di immagini portali è di poter risalire alla dose assorbita dal paziente intesa come dose emergente all'isocentro e distribuzione della dose nell'intero volume irradiato. Inoltre si vuole introdurre l'utilizzo di funzioni di correlazioni generalizzate che consentono di standardizzare il metodo e rendere quindi la procedura di implementazione del metodo più snella e rapida. In questo modo sarà possibile effettuare giornalmente in real time i controlli e monitorare rapidamente la situazione del paziente.

Le informazioni fornite dalla dosimetria in vivo tramite EPID potranno essere integrate con le nuove tecnologie presto in nostro possesso (Cone Beam CB-CT, IMRT, IGRT) a fine di rendere il trattamento radioterapico sempre più vicino alla situazione reale del paziente.

La conoscenza in tempo reale dell'anatomia della regione trattata durante la somministrazione dell'irradiazione, mediante l'utilizzo della Cone Beam CT renderà possibili interventi adattativi nel corso del trattamento, in relazione al riscontro giornaliero di eventuali modificazioni della lesione neoplastica quali conseguenza di risposta al trattamento. Lo scopo della radioterapia adattativa è la ricostruzione della dose effettivamente impartita al paziente durante il trattamento in modo da riadattare l'irradiazione nel caso in cui la dose somministrata risulti differente dalla dose pianificata. La possibilità di localizzare il target con precisione e di riconformare la dose tenendo conto delle modificazioni interfrazione e intrafrazione che intervengono nel corso del trattamento consentirà di ottenere:

dose escalation sui volumi tumorali e risparmio dei tessuti sani;
miglior controllo loco-regionale della malattia e riduzione della tossicità della cura;
implementazione di schemi di ipofrazionamento e quindi positive ricadute in termini di abbattimento delle liste di attesa e riduzione dei disagi ai pazienti.

Con l'IMRT saremo inoltre in grado di applicare margini più stretti e più alti gradienti di dose rispetto alla RT convenzionale, massimizzando la dose al bersaglio e riducendo al minimo la dose agli OARs. Nel progetto è prevista l'implementazione del nuovo linac con IMRT e CBCT (componenti hardware e loro parametri di funzionamento).

Grazie alla possibilità di trattamenti radioterapici sempre più mirati con strumenti di nuova generazione è oggi necessario conoscere al meglio il volume neoplastico da irradiare e seguirne gli spostamenti. La Tomografia a Emissione di Positroni (PET) è oggi riconosciuta come metodica di grande rilievo per la stadiazione e la ristadiazione del paziente oncologico. La visualizzazione della distribuzione del tracciante permette di individuare, sia la neoplasia che la sua disseminazione a distanza.

La metodica viene oggi utilizzata per la definizione dei volumi di trattamento che vengono determinati tenendo conto non solo dei parametri tradizionali di alterazione anatomica TC, ma anche dell'alterazione biologica misurata con PET. L'efficacia di tecniche come l'IMRT può essere potenziata dall'impiego della PET per la definizione delle caratteristiche biologiche delle lesioni e dal controllo degli errori dovuti al movimento d'organo e della lesione. In questo contesto l'utilizzo delle metodologie di acquisizione 4D PET e 4D TC, che permettono l'acquisizione sincronizzata dei dati con il ciclo respiratorio del paziente, rappresentano uno strumento importante proprio per la rilevazione e la quantificazione dei movimenti spazio temporali delle lesioni tumorali e degli organi circostanti. Nelle acquisizioni 4D PET e 4D TC il ciclo respiratorio del paziente viene suddiviso in fasi temporali in cui vengono registrati i dati. L'utilizzo dei dati consente un approccio più preciso ed accurato nella definizione del piano di trattamento radioterapico. In particolare, la conoscenza del volume spaziale in cui avviene il movimento della lesione come conseguenza dell'atto respiratorio del paziente, consente una personalizzazione nella definizione del piano di trattamento, mentre l'utilizzo delle immagini (PET, TC, MRI) corrispondenti alle diverse fasi del ciclo respiratorio dovrebbe permettere una più accurata valutazione del rapporto tra posizione del tumore ed organi a rischio circostanti.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

In conclusione, la possibilità di monitorare i movimenti della lesione da irradiare e degli organi circostanti, mediante tecniche di acquisizione EPID, 4D PET- TC e MRI rappresenterà una tematica di ricerca molto interessante nell'ambito delle applicazioni di radioterapia più avanzate (IMRT) in una prospettiva di trattamenti sempre più precisi, accurati e personalizzati.

3 : Applicazioni ed integrazione della RM 3 Tesla nello studio delle patologiche oncologiche

Responsabile: CAMMAROTA ALDO

Programma:

Parole chiave:

Altri enti coinvolti:

Anno inizio: 2010

Durata: 24

Tipologia: Metodologica

Area di interesse: Diagnostica

Descrizione: Il progetto si articola in 4 sottoprogetti per la valutazione dell'utilizzo della RM 3 Tesla in pazienti con Glioma di alto grado, Tumore della Mammella e Tumore della Prostata.

1) STUDIO DELLE NUOVE STRATEGIE DIAGNOSTICO-TERAPEUTICHE NEI PAZIENTI AFFETTI DA GLIOMA DI ALTO GRADO (WHO III-IV)

Stato dell'arte nel campo

I gliomi del sistema nervoso centrale sono un gruppo eterogeneo di neoplasie che rappresentano circa l'86% dei tumori primitivi ed includono neoplasie astrocitarie ed oligodendrogliali, caratterizzate da diversi gradi di malignità e da comportamento clinico e biologico estremamente variabile. La terapia dei tumori cerebrali presenta problematiche relative alle peculiarità del parenchima cerebrale. Inoltre, la tendenza di alcuni tumori cerebrali, quali gli astrocitomi, ad infiltrare estesamente il parenchima sano ed a recidivare spesso con un grado di maggiore malignità, rendono la prognosi di queste lesioni spesso infausta. In base alla classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, le forme più maligne sono il grado III-IV.

Nonostante i continui progressi della chirurgia, e dei trattamenti chemio e radioterapici adiuvanti, la prognosi di questi pazienti rimane pessima con una sopravvivenza mediana compresa tra 12-16 mesi.

Il neuroimaging diagnostico delle neoplasie cerebrali trova il suo gold standard nella risonanza magnetica (RM), che, per i principi su cui si basa, permette la visualizzazione di alterazioni anche di minima entità. Le tecniche convenzionali presentano tuttavia una non completa accuratezza nel localizzare e nel caratterizzare la neoplasia, in particolare per quanto riguarda il grading tumorale, sottostimando la reale estensione del tumore, e trovando difficoltà nel porre diagnosi differenziale tra tessuto neoplastico e tessuto edematoso privo di caratteristiche patologiche ed alterazioni correlabili alle terapie adiuvanti (radio e chemioterapia). Negli ultimi anni, sono diventate sempre più di aiuto le nuove acquisizioni nel campo delle tecniche avanzate di RM, quali la spettroscopia (MRS), la diffusione (DWI) ed il tensore di diffusione (DTI), la perfusione (PWI) e la RM funzionale (fMRI), che sono in grado di combinare informazioni strutturali e morfologiche con i dati biochimici e fisiologici.

La MRS, mediante la valutazione dei metaboliti cerebrali, fornisce informazioni sulle modificazioni biochimiche nel tumore e potrebbe essere in grado di dare un valore predittivo di grado istologico con una tecnica non invasiva.

La DWI fornisce informazioni sulla misura della diffusività media e del coefficiente di diffusione apparente (ADC), che correlano con la cellularità del tumore.

Lo studio di PWI, attraverso la determinazione di rCBV (relative cerebral blood volume), CBF (cerebral blood flow), MTT (mean transit time) e TTP (time to peak) consente di indagare la vascolarizzazione tumorale e la neoangiogenesi, criterio istopatologico estremamente importante nella valutazione della malignità dei gliomi.

Numerosi studi hanno dimostrato la stretta correlazione tra rCBV e grading tumorale e la più recente letteratura attribuisce allo studio di perfusione un importante valore prognostico per quanto riguarda la sopravvivenza dei Pazienti con gliomi di alto grado.

Scopo dello studio è valutare con tecniche avanzate, quali diffusione (DWI) e spettroscopia (MRS) con Risonanza Magnetica 3 Tesla di un gruppo di Pazienti affetti da Gliomi di alto grado (WHO III-IV). Ci proponiamo di applicare le tecniche avanzate di risonanza magnetica per estrapolare informazioni sulla diagnosi differenziale tra tessuto cicatriziale o/e presenza di malattia

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

dopo resezione chirurgica e sulla diagnosi differenziale tra tessuto cicatriziale o/e recidiva di malattia o/e radionecrosi dopo il trattamento radiochemioterapico, anche nell'ottica di poter meglio definire il volume di malattia per la personalizzazione del trattamento radiante: aumento della dose al target e risparmio dei tessuti sani (boost concomitante e/o sequenziale con tecniche avanzate di radioterapia).

Bibliografia

- 3) C. Weltens, J. Menten, M. Feron et al Interobserver variations in gross tumor volume delineation of brain tumors on computed tomography and impact of magnetic resonance imaging, *Radiotherapy and Oncology* 2001; 60: 49-59.
- 4) Hidefumi A., Hiroki S. Takeshi N. et al Magnetic resonance imaging system for three dimensional conformal radiotherapy and its impact on gross tumor volume delineation of central nervous system tumors, *Int.J.Rad.Onc.Biol.Phys.* 2001;50:821-827.
- 5) Paulus W, Peiffer J., Intratumoral histologic heterogeneity of gliomas. A quantitative study *Cancer* 1989, 64: 442-447.
- 6) T. Pfluger, C. Vollmar, A. Wismuller et al Quantitative comparison of automatic and interactive methods for MRI and SPECT image registration of the brain based on 3 Dimensional calculation of error, *J. Nuc. Med.* 2000; 41:1823-1829.
- 7) Bianchi MC, Tosetti M, Canapicchi R: Tumori cerebrali. In M, Cammisa, T. Scarabino, T Popolizio et Al: *Progressi in RM. Spettroscopia protonica cerebrale.* Gnocchi Editore, Napoli, pg 29-43,1999
- 8) Brand A., Richter-Landsberg C., Leibfritz D.: Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of guai and neuronal cells. *Dev Neurosci* 15:289-298, 1993.
- 9) De Stefano N, Caramanos Z, Preul et Al: In vivo differentiation of astrocytic brain tumours and isolated demyelinating lesions of the type seen in multiple sclerosis using H magnetic resonance spectroscopic imaging. *Ann Neurol* 44:273-278,1998
- 10) Go KG, Kamman RL, Mooyaart EL et Al: Localised proton spectroscopy and spectroscopic imaging in cerebral gliomas, with comparison to positron emission tomography. *Neuroradiology* 37:198-206,1995
- 11) Herminghaus N Möller-Hartmann W, Wittsack J et Al: Grading of astrocytomas using spectral pattern recognition analysis of in vivo spectroscopic data. *Riv Neuroradiol* 11:81-83,1998
- 12) Kim SH, Chang KH, Song IC et Al: Brain abscess and brain tumour:discrimination with in vivo H-1 MR spectroscopy. *Radiology* 204:239-245,1997

2) UTILIZZO DI NUOVE STRATEGIE DIAGNOSTICHE PER LO STUDIO DELLA MAMMELLA.

Stato dell'arte nel campo

Il tumore della mammella è la più frequente neoplasia e tra le prime cause di morte per tumore nella popolazione femminile negli ultimi 10 anni si è avuta una riduzione della mortalità per carcinoma della mammella grazie alla diagnosi precoce e ad una adeguata terapia nelle varie fasi della malattia.

Lo screening mammografico rappresenta la metodica fondamentale per l'identificazione di tumori in fase iniziale, per i quali è più probabile la guarigione.

Lo screening e il follow-up del tumore alla mammella si basa su uno studio di imaging multi-modale che si basa su RX mammografia, ecografia TC e RM, e valuta i cambiamenti riguardanti le dimensioni, la densità e il contrast enhancement. L'alta sensibilità della mammografia si accompagna ad una bassa specificità.

Con l'utilizzo di apparecchiature RM ad alto campo e con l'avvento delle nuove modalità di imaging nella risonanza magnetica, quali la Spettroscopia (MRS), che mediante la valutazione dei metaboliti, fornisce informazioni sulle modificazioni biochimiche nel tumore e potrebbe dare un valore predittivo di grado istologico con una tecnica non invasiva e la DWI che fornisce informazioni sulla misura della diffusività media e del coefficiente di diffusione apparente (ADC), correlati con la cellularità del tumore, saremo in grado di combinare informazioni strutturali e morfologiche con i dati biochimici e fisiologici, per una più sensibile e specifica identificazione del tumore e per una più precisa risposta al trattamento.

Studi precedenti, effettuati in vivo e in vitro con 1H-MRS hanno valutato una elevata concentrazione di colina nel tessuto neoplastico maligno, a differenza del tessuto neoplastico benigno e di quello sano.

Ci proponiamo di utilizzare le tecniche avanzate di risonanza magnetica, in particolare la spettroscopia (1H-MRS), a supporto delle tecniche convenzionali di imaging RM impiegate attualmente per lo studio della mammella.

Bibliografia

Combined DCE-MRI and single-voxel 2D MRS for differentiation between benign and malignant breast lesions.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Lipnick S, Liu X, Sayre J, Bassett LW, Debruhl N, Thomas MA.
NMR Biomed. 2010 Oct;23(8):922-30.
Breast MR imaging: current indications and advanced imaging techniques.
Weinstein S, Rosen M.
Radiol Clin North Am. 2010 Sep;48(5):1013-42. Review.
Early detection of recurrent breast cancer using metabolite profiling.
Asiago VM, Alvarado LZ, Shanaiah N, Gowda GA, Owusu-Sarfo K, Ballas RA, Rafferty D.
Cancer Res. 2010 Nov 1;70(21):8309-18. Epub 2010 Oct 19.
Role of breast MR imaging in neoadjuvant chemotherapy.
Le-Petross HC, Hylton N.
Magn Reson Imaging Clin N Am. 2010 May;18(2):249-58, viii-ix. Review.
1H MR spectroscopy of invasive ductal carcinoma: correlations with FDG PET and histologic prognostic factors.
Tozaki M, Hoshi K.
AJR Am J Roentgenol. 2010 May;194(5):1384-90.

3) TUMORE DELLA PROSTATA:UTILITA DELLA RM AD ALTO CAMPO PER LA IDENTIFICAZIONE DELLA PATOLOGIA , E PER LA FOCALIZZAZIONE DI UNICO BERSAGLIO BIOPTICO.

Stato dell'arte nel campo

Il tumore alla prostata colpisce prevalentemente gli ultracinquantenni ed è considerato la seconda causa di morte per cancro negli USA dopo il tumore del polmone.

Con l'utilizzo di apparecchiature RM ad alto campo e con l'avvento delle nuove modalità di imaging nella risonanza magnetica, quali la diffusione (Diffusion Weighted Imaging - DWI) e l'imaging dinamico con mezzo di contrasto endovenoso (Dynamic Contrast-Enhanced MRI DCE MRI), è nato il concetto di imaging RM multimodale o multiparametrico, in cui la valutazione morfologica si arricchisce di ulteriori informazioni che aumentano la performance diagnostica della metodica. I vantaggi dell'imaging RM multimodale trovano ampio riscontro nel riconoscimento e nella stadiazione del carcinoma della prostata. Una migliore e quanto più precisa identificazione del tumore alla prostata con l'imaging permette all'urologo l'esecuzione di biopsie mirate che riducono i falsi negativi e i falsi positivi.

L'obiettivo del nostro lavoro è determinare l'efficacia di uno studio combinato di RM 3 tesla con bobina flex utilizzando sequenze T2 pesate, DWI e sequenze dinamiche nell'identificazione del tumore alla prostata offrendo all'urologo indicazioni per una biopsia più mirata e pianificare l'eventuale successivo trattamento.

Bibliografia

Prostate cancer: prediction of extracapsular extension with endorectal MR imaging and three-dimensional proton MR spectroscopic imaging.

Yu KK, Scheidler J, Hricak H, Vigneron DB, Zaloudek CJ, Males RG, Nelson SJ, Carroll PR, Kurhanewicz J.
Radiology. 1999 Nov;213(2):481-8.

Prostate cancer: localization with three-dimensional proton MR spectroscopic imaging--clinicopathologic study.

Scheidler J, Hricak H, Vigneron DB, Yu KK, Sokolov DL, Huang LR, Zaloudek CJ, Nelson SJ, Carroll PR, Kurhanewicz J.
Radiology. 1999 Nov;213(2):473-80.

Correlation between metabolite ratios and ADC values of prostate in men with increased PSA level.

Kumar V, Jagannathan NR, Kumar R, Das SC, Jindal L, Thulkar S, Gupta SD, Dwivedi SN, Roell S, Hemal AK, Gupta NP.
Magn Reson Imaging. 2006 Jun;24(5):541-8. Epub 2006 Mar 6.

Prostate cancer detection: comparison of T2-weighted imaging, diffusion-weighted imaging, proton magnetic resonance spectroscopic imaging, and the three techniques combined.

Chen M, Dang HD, Wang JY, Zhou C, Li SY, Wang WC, Zhao WF, Yang ZH, Zhong CY, Li GZ.

Acta Radiol. 2008 Jun;49(5):602-10.

Diffusion-weighted imaging with apparent diffusion coefficient mapping and spectroscopy in prostate cancer.

Jacobs MA, Ouwerkerk R, Petrowski K, Macura KJ.

Top Magn Reson Imaging. 2008 Dec;19(6):261-72. Review.

[The relevance of magnetic resonance imaging (MRI) for the detection and exclusion of prostate cancer].

Stattaus J, Forsting M.

Urologe A. 2010 Mar;49(3):351-5. German.

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

4) SPETTROSCOPIA PROSTATICA CON RISONANZA MAGNETICA AD ALTO CAMPO IN PAZIENTI CON TUMORE DELLA PROSTATA.

Il tumore alla prostata si sviluppa più frequentemente negli ultracinquantenni, è il secondo più comune tipo di tumore nel mondo, dove è responsabile del maggior numero di morti da tumore, dopo il tumore dei polmoni.

Lo screening del carcinoma prostatico si basa sull'esplorazione digito-rettale della prostata e sul dosaggio sierico del PSA (indicatore di sofferenza prostatica, non vero e proprio marcatore tumorale).

Il valore predittivo positivo dei due è pari al 30-50%, ovvero il 50-70% dei soggetti sottoposti a biopsia sulla scorta di tali esami non risulta affetto da carcinoma.

Anche se la diagnosi precoce, effettuata quando la malattia è ancora confinata all'organo,

e le relative terapie hanno consentito una riduzione del rischio di morte statisticamente

significativo, la variabilità dell'evoluzione naturale della neoplasia non consente, ancora oggi di valutare quali tumori

diventeranno clinicamente significativi e quali rimarranno

dormienti a vita.

Tutto questo solleva forti timori sui rischi di overdiagnosis e overtreatment considerate le complicanze e gli effetti collaterali

delle terapie praticate specie sulla funzione sessuale

e sulla continenza urinaria.

La spettroscopia con tecnica di Risonanza magnetica (mrs) è una metodica di studio di recente applicazione clinica che consente di ottenere informazioni metaboliche ed istologiche ultrastrutturali del tessuto in esame in vivo e/o in vitro, è perciò uno strumento diagnostico che offre informazioni dettagliate sulla composizione chimica dei campioni dei tessuti.

L'utilizzazione di un tomografo per Risonanza Magnetica a 3 Tesla consente in generale di ottenere informazioni anatomico-strutturali di altissima risoluzione spaziale, dell'ordine dei decimi di millimetro con tempi inferiori ed equivalenti a quelli necessari per esame ordinario millimetrico a campo basso e medio (fino 1.5 Tesla) aprendo nuove possibilità alla radiologia diagnostica in particolare per la valutazione della K prostatico sia in vivo che eventualmente in vitro.

Esplorare la possibilità di effettuare uno studio combinato di risonanza magnetica del cancro prostatico di tipo morfologico (MRI), spettroscopico dell'idrogeno (MRSI) e dinamico postcontrastografico (DCE-MRI) a 3 Tesla utilizzando una bobina pelvica flex.

L'obiettivo è quello di individuare e localizzare il carcinoma prostatico, rapportandolo successivamente agli effettivi esiti istologici.

Bibliografia

Prostate cancer: prediction of extracapsular extension with endorectal MR imaging and three-dimensional proton MR spectroscopic imaging.

Yu KK, Scheidler J, Hricak H, Vigneron DB, Zaloudek CJ, Males RG, Nelson SJ, Carroll PR, Kurhanewicz J.

Radiology. 1999 Nov;213(2):481-8.

Prostate cancer: localization with three-dimensional proton MR spectroscopic imaging--clinicopathologic study.

Scheidler J, Hricak H, Vigneron DB, Yu KK, Sokolov DL, Huang LR, Zaloudek CJ, Nelson SJ, Carroll PR, Kurhanewicz J.

Radiology. 1999 Nov;213(2):473-80.

Correlation between metabolite ratios and ADC values of prostate in men with increased PSA level.

Kumar V, Jagannathan NR, Kumar R, Das SC, Jindal L, Thulkar S, Gupta SD, Dwivedi SN, Roell S, Hemal AK, Gupta NP.

Magn Reson Imaging. 2006 Jun;24(5):541-8. Epub 2006 Mar 6.

Prostate cancer detection: comparison of T2-weighted imaging, diffusion-weighted imaging, proton magnetic resonance spectroscopic imaging, and the three techniques combined.

Chen M, Dang HD, Wang JY, Zhou C, Li SY, Wang WC, Zhao WF, Yang ZH, Zhong CY, Li GZ.

Acta Radiol. 2008 Jun;49(5):602-10.

Risultati e prodotti conseguiti:

Attività previste 1 STUDIO

Compito dell'unità di ricerca sarà la gestione clinica del paziente, dal trattamento chirurgico, ai trattamenti chemio e radioterapici adiuvanti.

ARRUOLAMENTO PAZIENTI

Si prevedono di includere nello studio:

20 pazienti con diagnosi istologica di Glioma di Alto grado (Astrocitoma Anaplastico, Oligodendroglioma Anaplastico,

Programma per la ricerca corrente degli IRCCS 2011

Progetti

Centro di riferimento oncologico della Basilicata

Oligoastrocitoma Anaplastico WHO III e Glioblastoma Multiforme e Gliosarcoma WHO IV) eta' compresa tra 18-80 anni trattati chirurgicamente con asportazione tumorale totale e/o parziale.

Tutti i pazienti verranno sottoposti a:

- protocollo radiologico post-operatorio che includera' sequenze RM tradizionali e avanzate (diffusion, fiber tracking, spettroscopia)
- a trattamento radioterapico frazionato (40-60 Gy per 4-6 settimane) con Temozolomide (TMZ) concomitante (75mg/m2)
- a trattamento chemioterapico adiuvante con TMZ (150mg/mq per il 1 ciclo indi 200 mg/m2 x 5 giorni ogni 28 per 5 cicli) come prima linea
- protocollo radiologico post-radioterapico che includera' sequenze RM tradizionali e avanzate (diffusion, fiber tracking, spettroscopia).

I dati grezzi , da usarsi nell'analisi statistica, verranno utilizzati per valutazione descrittiva, corredata di tabelle e figure di valori medi, deviazioni standard o valori di frequenza relativa (%).

Lo studio verrà effettuato in collaborazione con la fisica-sanitaria e la radioterapia di questo istituto.

In relazione al numero elevato di pazienti che giungono mensilmente presso l'u.o. di radiologia del nostro istituto di ricerca per eseguire esami diagnostici per lo studio della mammella, grazie alla disponibilità di un apparecchio di risonanza magnetica ad alto campo (3T) e grazie al supporto del u.o. di chirurgia e di anatomia patologica, ci proponiamo di effettuare uno studio spettroscopico sulle lesioni mammarie benigne, maligne e su tessuto sano al fine di valutare la correlazione esistente tra concentrazione di colina e lesione maligna.

ARRUOLAMENTO PAZIENTI

Si prevede di includere nello studio:

40 pazienti

eta' compresa tra 18-80 anni

Tutti i pazienti verranno sottoposti a:

- protocollo radiologico che includera' sequenze RM tradizionali e avanzate (spettroscopia).

2 STUDIO

Verrà effettuato in collaborazione con la Fisica-sanitaria , la chirurgia generale e l'anatomia patologica di questo Istituto

I dati grezzi , da usarsi nell'analisi statistica, verranno utilizzati per valutazione descrittiva, corredata di tabelle e figure di valori medi, deviazioni standard o valori di frequenza relativa (%).

3 STUDIO

30 pazienti verranno sottoposti consecutivamente ad esplorazione digito rettale per dosaggi di PSA elevati e all'esame di risonanza magnetica e successiva biopsia rettale.

Lo studio di risonanza magnetica verrà effettuato con apparecchio 3T e con bobina flex . L'esame verrà eseguito prima della biopsia e verranno effettuate in particolare sequenze T2 pesate sequenze DWI e sequenze dinamiche dopo iniezione di mdc. Successivamente i pazienti verranno sottoposti a biopsia random e mirate a seconda dei casi.

I dati grezzi , verranno utilizzati per valutazione descrittiva, corredata di tabelle e figure di valori medi, deviazioni standard o valori di frequenza relativa (%).

4 STUDIO

Si prevede di valutare 50 pazienti con diagnosi istologica di cancro della prostata, valutati sia nel complesso, sia in relazione al Gleason score.