

# NUOVI MARCATORI TUMORALI E ANALISI SIEROPROTEOMICA NELLA DIAGNOSI E NELLA PROGNOSI DELLA PATOLOGIA TUMORALE

Centro di Riferimento Oncologico - Istituto Nazionale Tumori - IRCCS Aviano  
Unità di Patologia Oncologica  
Responsabile Dott. Agostino Steffan

## 1. Studio di nuovi marcatori tumorali

*Background:* Il **biomarcatore tumorale** viene definito come “qualsiasi segnale biologico correlato alla presenza di una neoplasia”.

Per valutare correttamente il valore e la plausibilità clinica di una determinazione è necessario:

- conoscere la condizione morbosa indagata;
- conoscere le eventuali terapie in corso o precedenti;
- nelle specifiche condizioni cliniche, eseguire una valutazione pretrattamento (es. pre-operatoria);
- conoscere l'esistenza di possibili cause non neoplastiche di incremento delle concentrazioni ematiche del biomarcatore; la specificità dell'informazione fornita non è mai assoluta, né per un dato istotipo tumorale, né per la condizione neoplastica in genere;
- confermare sempre con un successivo dosaggio un valore considerato abnorme, prima di eventuali decisioni cliniche.

Il marcatore di neoplasia ideale, per dimostrare un elevato grado di validità diagnostica, dovrebbe essere caratterizzato da:

- 1-attendibilità analitica dei mezzi di determinazione;
- 2-specificità diagnostica (diagnosi di tumore, localizzazione del tumore);
- 3-sensibilità diagnostica (diagnosi precoce di tumore).

Alla luce del limitato grado di affidabilità dei marcatori tumorali utilizzati nella pratica clinica, sebbene siano molteplici le loro possibili applicazioni, l'uso corrente e più documentato in letteratura consiste in:

- Valutazione della risposta alla terapia
- Rilevamento precoce delle recidive (follow-up)
- Ausilio diagnostico e prognostico (applicazione più circoscritta rispetto alle precedenti)

In questo studio ci proponiamo di utilizzare nuovi marcatori tumorali, in associazione a quelli più tradizionali, principalmente come fattori prognostici, monitorando l'andamento tumore/terapia, tramite una valutazione longitudinale, nei pazienti (aumento/diminuzione significativi della concentrazione ematica).

### 1.1 I nuovi marcatori tumorali nelle neoplasie polmonari e dell'ovaio

*Background:* Risultati recenti indicano l'angiogenesi tumorale come uno dei fenomeni biologici più importanti ai fini della crescita e della metastatizzazione neoplastica. Il **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)** è uno dei fattori angiogenici più importanti ed è una citochina che regola la proliferazione, differenziazione e sopravvivenza dell'endotelio microvascolare. I valori di VEGF dosabili nel siero/plasma di pazienti affetti da neoplasia polmonare ed ovarica hanno portato a

conclusioni non sempre univoche in quanto, mentre i livelli della citochina sembrano correlare nei vari lavori con l'estensione di malattia alla diagnosi, il suo ruolo come fattore prognostico indipendente per sopravvivenza libera da malattia e globale non è stato sempre confermato. Peraltro l'overespressione del VEGF è stata descritta in molte neoplasie umane nelle quali è stata correlata ad una prognosi sfavorevole.

**L'interleuchina 8 (IL-8)**, appartenente alla famiglia delle chemochine, è stata inizialmente descritta come un fattore di chemiotassi per i neutrofili; più recentemente si è dimostrata un potente fattore angiogenetico in grado di indurre chemiotassi e proliferazione di cellule endoteliali *in vivo* e *in vitro*. Differenti studi hanno dimostrato che linee cellulari di astrocitoma, epatocarcinoma e melanoma esprimono l'IL-8 e che l'espressione della citochina è associata al potenziale angiogenetico e metastatico di cellule di melanoma trapiantate nel topo nudo. L'overespressione dell'interleuchina-8 è stata dimostrata anche *in vivo* in neoplasie cervico-facciali, nel melanoma e nel glioblastoma; inoltre un'elevata espressione dei recettori per l'IL-8 è stata descritta in differenti forme neoplastiche.

Alla luce di queste premesse, abbiamo ipotizzato che il dosaggio sierico di uno o più fattori associati all'angiogenesi e all'invasione tumorale possa essere utile per l'identificazione di patologie maligne polmonari e ovariche a peggior prognosi. In particolare, in questo studio si intende valutare se i pazienti neoplastici con un incremento delle concentrazioni sieriche di VEGF e di IL-8 (anche attraverso l'aumentata espressione di metalloproteinasi indotta da quest'ultima) presentino una variante più aggressiva della patologia tumorale. Queste premesse rappresentano anche il razionale per sviluppare molecole in grado di svolgere attività antitumorale ed antiangiogenetica interferendo ad esempio con il VEGF stesso o comunque con molecole in grado di modulare positivamente la neoangiogenesi tumorale come ad esempio la cicloossigenasi -2 (COX-2).

**Il carcinoma ovarico** è la più comune causa di morte per neoplasie ginecologiche, presumibilmente a causa della frequente diagnosi tardiva. In Italia il tasso d'incidenza standardizzato relativo ai dati dei Registri Tumori negli anni 1993-1998 è pari a 13,5 su 100.000.

L'eziologia e la patogenesi di questa neoplasia sono ancora incerti. La multiparità, l'uso prolungato di estroprogestinici orali e l'allattamento al seno sono fattori associati a una diminuzione del rischio, mentre la nulliparità, l'uso di farmaci per l'induzione dell'ovulazione e una storia familiare di tumore dell'ovaio, della mammella e del colon rappresentano fattori di rischio per lo sviluppo della malattia. Il marcatore più utilizzato, nella pratica clinica, per la patologia neoplastica dell'ovaio è **Ca125**, una glicoproteina, prodotta da alcuni carcinomi ovarici, che può essere riconosciuta grazie a un anticorpo monoclonale. Il solo aumento del Ca125 è ritenuto insufficientemente predittivo dello sviluppo o presenza di un carcinoma ovarico. Inoltre un suo aumento è presente in altri quadri clinici ginecologici benigni quali l'endometriosi, la PID (malattia pelvica infiammatoria) e i leiomiomi uterini. Utilizzato, per lo più in associazione all'ecografia pelvica, nell'ambito dei programmi di screening del carcinoma ovarico, Ca125 è molto affidabile nel monitoraggio: un incremento persistente è invariabilmente associato a ripresa di malattia, viceversa valori bassi indicano una buona risposta al trattamento chemioterapico.

**Il carcinoma del polmone** rappresenta la prima causa di morte nei paesi industrializzati. Il 90% dei tumori del polmone sono correlati al fumo di sigaretta. L'incidenza varia a seconda delle diverse aree geografiche: è più alta in Nord Europa, Stati Uniti e Canada; si riduce in Giappone, Israele e Svezia. In Italia il numero di nuovi casi per anno si aggira intorno ai 35-40.000/100.000 abitanti, con un tasso di mortalità di 81/100.000 nei maschi e 12/100.000 nelle donne.

Il carcinoma del polmone è noto per non avere un marcatore specifico di malattia; si ritiene che uno studio sull'espressione di VEGF e IL-8, in associazione a **MUC-1 (Ca15-3)** e a **CYFRA 21-1**, possa fornire dati utili per attribuire o meno un ruolo prognostico a questi marcatori.

CYFRA 21-1 (frammento 21-1 della citocheratina 19) è usato come marcatore di diversi tipi di tumore polmonare e la sua concentrazione plasmatica è proporzionale alla massa del tumore e alla sua aggressività. Valori oltre la norma possono però essere associati anche a cause non neoplastiche, come alcune patologie polmonari benigne in corso di infezioni acute. CYFRA 21-1 è utile nel predire la risposta alla terapia ed è descritto in letteratura come una possibile co-variabile nella valutazione della prognosi dei pazienti con NSCLC.

Ca15-3, che come Ca125 è una glicoproteina identificata da un anticorpo monoclonale, presenta una ottima sensibilità nelle neoplasie della mammella. Nel 75-90% dei casi di tumore al seno con metastasi, l'antigene Ca15-3 raggiunge livelli superiori a 30 U/ml. Aumenti del Ca15-3, ma inferiori a 50 U/ml, sono riscontrabili anche nella neoplasia del polmone (40%).

Questo test non è però abbastanza sensibile e specifico ed è perciò sconsigliabile il suo uso per la diagnosi precoce di queste malattie; in compenso può essere utile nel controllare l'andamento della risposta alla chemioterapia e nel follow-up postoperatorio.

**Lo scopo di questo lavoro è quello di verificare:**

- **il ruolo prognostico dei fattori VEGF e IL-8 nella neoplasia ovarica e in quella polmonare;**
- **la correlazione tra i valori di VEGF e IL-8 e i valori di Ca15-3 e CYFRA 21-1 nella neoplasia polmonare;**
- **la correlazione tra i valori di VEGF e IL-8 e i valori di Ca125 nella neoplasia ovarica.**

**E' inoltre ipotizzabile un ulteriore sviluppo del progetto descritto, sempre nell'ambito della ricerca di nuovi bio-marcatori sierici. La collezione di sieri, raccolti e stoccati in apposita banca biologica, potrebbe essere utilizzata infatti per un'analisi sieroproteomica delle neoplasie studiate.**

## **2. Analisi sieroproteomica in soggetti sottoposti a screening per la diagnosi precoce dei carcinomi del colon-retto**

*Background:* **Il carcinoma del colon-retto** rappresenta la seconda causa di morte per neoplasia nei paesi occidentali, in entrambe i sessi. In Italia sono stimati 38.000 nuovi casi l'anno e 19.500 decessi dovuti a questa neoplasia. Se diagnosticato nelle sue fasi iniziali il carcinoma del colon-retto è altamente curabile (90% di sopravvivenza a 5 anni nei pazienti con tumori in stadio 1). Poiché questo tumore si forma mediante un processo di trasformazione a tappe multiple denominato "sequenza adenoma-carcinoma" che richiede un lungo periodo (circa 10 anni) è possibile giungere ad una importante riduzione dell'incidenza e della mortalità mediante asportazione degli adenomi e diagnosi precoce dei carcinomi. Su questo principio si basano i programmi di screening che hanno dimostrato di essere altamente efficaci e che utilizzano la ricerca del sangue occulto nelle feci, e procedure endoscopiche (retto-sigmoidoscopia o colonscopia). L'attuazione dei programmi di screening è però limitata dalla scarsa "compliance" della popolazione (inferiore al 50%) dovuta in gran parte anche alla invasività delle procedure endoscopiche. Allo stato attuale non esistono bio-marcatori per la diagnosi precoce dei tumori del colon-retto, inoltre, la ricerca del sangue occulto nelle feci ha una sensibilità ed una specificità non ottimali. La disponibilità di bio-marcatori altamente sensibili e specifici consentirebbe un utilizzo delle procedure diagnostiche più mirato ed efficace.

Recentemente sono comparsi in letteratura numerosi studi che hanno riportato valori di elevata sensibilità e specificità di **profili sieroproteomici** in diversi tipi di neoplasie (ovaio, prostata, pancreas, polmone, epatocarcinoma).

Alcuni marker neoplastici sono generati ed amplificati all'interfaccia tumore-ospite attraverso cascate enzimatiche che determinano tagli e raggruppamenti dei prodotti del processo neoplastico; come conseguenza, il profilo delle proteine sieriche a basso peso molecolare può riflettere lo stato patologico dei diversi organi ed essere utile nella diagnosi precoce dei tumori.

Gli spettrometri di massa ESI (electrospray ionisation) e MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption and ionisation time-of flight) posseggono la sensibilità e precisione migliore per le proteine a basso peso molecolare. In particolare il SELDI-TOF (surface-enhanced laser desorption and ionisation time-of-flight), un perfezionamento del MALDI-TOF, utilizza la superficie di una barra metallica ricoperta con una sostanza chimica specifica che lega un sottogruppo di proteine all'interno del campione di siero. Recentemente è stato sviluppato uno strumento di analisi informatica che combina elementi dagli algoritmi genetici e dai metodi di cluster analysis self-organising. Vengono selezionati casualmente centinaia di milioni di pattern proteici che sono testati attraverso la cluster analysis al fine di identificare quel gruppo o quei gruppi che meglio distinguono i casi affetti dai non affetti. I pattern di proteine che superano questa selezione sono presi e confrontati fra di loro, scartando i pattern che si dimostrano meno significativi. Alla fine, dopo molti passaggi attraverso l'algoritmo, emerge il pattern migliore. Nella seconda fase, questo pattern, che meglio separa i dati usati per l'apprendimento, è usato per classificare i campioni sconosciuti che vengono immessi per convalidare il test.

I peptidi caratterizzanti i profili proteici associati alla presenza di tumore possono successivamente venire analizzati mediante ulteriore spettrometria di massa (MS/MS) al fine di identificare potenziali nuovi singoli bio-marcatori.

**Gli obiettivi principali di questo programma di ricerca sono:**

- Identificazione di bio-marcatori sierici per la diagnosi precoce dei carcinomi del colon-retto in una popolazione di soggetti sottoposti a programma di screening.
- Identificazione di bio-marcatori sierici associati alla presenza di un carcinoma coloretale in un sottogruppo di soggetti ad elevato rischio eredo-familiare di sviluppare un carcinoma coloretale sottoposti a screening intensivo.
- Confronto tra gli eventuali bio-marcatori identificati e le metodiche di screening attualmente utilizzate.

### **Il Centro di Riferimento Oncologico (CRO) IRCCS di Aviano**

Presso il CRO di Aviano sono disponibili le “facilities” cliniche, laboratoristiche e strutturali, ed il “know how” per l’attuazione dello studio proposto. In questa Struttura, vi è infatti ampio accesso ad una popolazione di soggetti che si sottopone a screening per la diagnosi precoce dei carcinomi coloretali nonché a pazienti neoplastici (polmone, ovaio, rinofaringe), candidabili per uno studio di tipo longitudinale; questo, unitamente ad un sistema organizzativo per la raccolta, processazione e stoccaggio di campioni biologici in maniera standardizzata e controllata, e per la registrazione di informazioni clinico-patologiche su supporti informatici dedicati. La Struttura è inoltre un centro di riferimento per le neoplasie ereditarie coloretali e per gli altri gruppi ad elevato rischio.

### **Trasferibilità**

La disponibilità di bio-marcatori altamente sensibili e specifici per la diagnosi precoce dei carcinomi più diffusi e/o più aggressivi avrebbe una rilevante ricaduta sul SSN in termini di efficacia e di riduzione dei costi. Questi bio-marcatori permetterebbero infatti l’esecuzione di indagini diagnostiche invasive e di terapie più mirate, con conseguente riduzione dei costi e maggiore attuabilità. Una collezione di sieri raccolti in maniera prospettica e controllata nell’ambito di un progetto di screening rappresenta inoltre uno strumento di elevato valore per l’eventuale validazioni di nuovi bio-marcatori emergenti.