

S.C. Genetica dei Tumori

Morte cellulare programmata: basi biologiche, implicazioni cliniche e sviluppo di modelli di terapia

Linea di ricerca: 1 – Oncologia Predittiva

Programma: c – Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica (proto-oncogeni, geni oncosoppressori, meccanismi di instabilità genomica, virus oncogeni)

Responsabile: Massimo Romani

Partecipanti: Claudio Brigati, Ida Casciano, Angela Di Vinci, Giorgio Allemanni

Durata: 2006-2008

Parole chiave: apoptosi; p53; p63; p73; caspasi

Altre strutture IST: S.C. Oncologia Medica A (F. Grossi); S.S. Tumori Polmonari (P. Russo); S.S. Oncologia Traslazionale Pediatrica (G.P. Tonini); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (B. Gatteschi)

Altri Enti coinvolti: Anatomia e Citoistologia Patologica, A.O. San Martino, Genova (J.L. Ravetti); Istituto G. Gaslini, Genova (M. Ponzoni); Anatomia Patologica, Università di Varese (F. Sessa); Chirurgia Toracica, Università Insubria, Varese (L. Dominioni)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: AIRC; Fondazione CARIGE; Associazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma

Background

La resistenza ai meccanismi di morte cellulare programmata è una delle caratteristiche più importanti della cellula tumorale che, attraverso mutazioni successive, porta alla formazione di cloni con ulteriori capacità maligne e maggiormente resistenti alla terapia.

Negli ultimi anni è stata riconosciuta l'importanza di p53 come gene preposto a fondamentali meccanismi di controllo della cellula ed in grado di indirizzare la cellula verso pathways di riparazione o di morte. Nella sua fondamentale funzione, p53 è coadiuvato da altri geni tra cui p63 e p73 con i quali costituisce la "famiglia genica p53".

A differenza di p53, sia p73 che p63 producono diverse varianti di processamento che presentano differenti interazioni omo- ed eterotipiche e diversa capacità transattivante.

Da un promotore alternativo a quello che produce la forma full length di p73 (TAp73) viene prodotta una isoforma troncata alla estremità ammino terminale (DeltaNp73) che agisce come dominante negativa ed ha una potente azione antiapoptotica che contrasta l'effetto proapoptotico di TAp73. p73 ha quindi la peculiarità di agire sia come gene oncosoppressore che come oncogene.

Il nostro gruppo si occupa da molti anni del ruolo di p73 nella tumorigenesi e, per primi, nel 2002, abbiamo dimostrato la rilevanza clinica della espressione di alcune varianti dominanti-negative di questo gene in tumori pediatrici (leucemie acute e neuroblastoma).

Una volta inviati i segnali che attivano la morte cellulare programmata, viene attivato un complesso meccanismo "a cascata" che porta alla liberazione di enzimi che hanno il compito di frammentare il DNA e di distruggere la cellula. Caspasi 8 (CASP8) è un gene all'apice della cascata effettrice ed è un gene chiave del processo apoptotico. Il nostro gruppo ha contribuito in maniera sostanziale alla comprensione dei meccanismi che regolano il funzionamento di questo gene.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo generale di questo progetto è quello di migliorare le conoscenze sulle funzioni, interazioni e meccanismi di regolazione di p73 e CASP8, due geni essenziali per la apoptosi che intervengono in fasi distinte del processo di morte cellulare programmata.

Beneficiari

Comunità scientifica.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Meccanismi di regolazione del gene Caspasi 8 – Abbiamo continuato gli studi diretti a comprendere i meccanismi di regolazione dell'espressione di questo gene-chiave dei meccanismi apoptotici e abbiamo analizzato in dettaglio i segnali che regolano l'espressione di CASP8 costitutiva ed indotta da interferoni.

Apparato trascrizionale, proliferazione ed apoptosi – La proliferazione cellulare è strettamente legata all'apoptosi e le alterazioni in uno dei due processi si riflettono necessariamente in alterazioni dell'altro. Abbiamo analizzato i livelli di espressione e i meccanismi che controllano la trascrizione di geni appartenenti alla classe del General Transcription Apparatus (GTA) e abbiamo dimostrato la ridotta espressione del gene NC2beta e, marginalmente di TAF12 e TAF13, in neuroblastomi. Questa osservazione suggerisce il coinvolgimento del complesso GTA nella patogenesi del neuroblastoma.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

DeltaNp73 nella fisiologia e patologia dei linfociti B – La forma antioncogenica e proapoptotica del gene p73 (TAp73) è epigeneticamente silenziata in leucemie e linfomi di Hodgkin. Nell'ottica di stabilire il ruolo della variante DeltaNp73 in linfomi B abbiamo inizialmente cercato di individuare l'eventuale funzione di questo gene nella fisiologia dei linfociti B. Abbiamo dimostrato che l'espressione di DeltaNp73 è una caratteristica delle cellule B attivate e che la sua espressione in cellule resting può essere indotta da un attivatore policlonale quale il Forbolo Miristato (TPA).

Il meccanismo di regolazione di DeltaNp73 è principalmente di tipo epigenetico in quanto sia il trattamento con TPA che quello con l'inibitore della deacetilasi istonica TSA inducono la demetilazione del promotore alternativo con un meccanismo indipendente dalla replicazione cellulare e che quindi potrebbe coinvolgere enzimi specifici con attività di "demetilasi".

Nell'ambito di questo progetto sono stati sviluppati modelli animali di neoplasie umane per lo sviluppo di terapie sperimentali

Elenco pubblicazioni:

De Ambrosis A.-Casciano I.-Croce M.-Pagnan G.-Radic L.-Banelli B.-Di Vinci A.-Allemanni G.-Tonini G.P.-Ponzoni M.-Romani M.-Ferrini S.

An interferon sensitive response element is involved in constitutive caspase/8 gene expression in neuroblastoma cells. Int. J. Cancer 120:39/47, 2006

Di Pietro C.-Ragusa M.-Barbagallo D.-Duro L.-Guglielmino M.- Majorana A.-Giunta V.-Rapisarda A.-Tricarichi E.-Miceli M.- Angelica R.-Grillo A.-Banelli B.-Defferari I.-Forte S.-Lagana' A.- Bosco C.-Giugno R.-Pulvirenti A.-Ferro A.-Grzeschik K.-Di Cataldo A.-Tonini G.P.-Romani M.-Purrello M.

Involvement of GTA protein NC2beta in neuroblastoma pathogenesis suggests that it physiologically participates in the regulation of cell proliferation.

Mol. Cancer 7:52;1/52;10, 2008

Brigati C.-Matis S.-Banelli B.-Cutrona G.-Casciano I.-Di Vinci A.-Borzi L.-Allemanni G.-Romani M.

Epigenetic signatures correlate with $\Delta NP73$ promoter function in human tonsil B cells.

Int. J. Cancer, submitted

Presentazione a convegni:

Romani M.-Cilli M.-Neumaier C.-Baio G.-Piccardi F.

Evaluation of temozolomide (TMZ) activity in a mouse model of brain metastases (BM) from breast cancer (BC).

J Clin Oncol 26, abstr. 12014, ASCO Meeting, Chicago, USA, 30 maggio – 2 giugno, 2008

Sviluppo di un microsistema di analisi per la identificazione di mutazioni e di polimorfismi genetici di rilevanza clinica

Linea di ricerca: 1 - Oncologia Predittiva

Programma: d – Nuove tecniche di diagnostica biologica e molecolare (test genetici e genetic counselling, DNA microarrays e profili di espressione genica, proteomica)

Responsabile: Massimo Romani

Partecipanti: Ida Casciano, Giorgio Allemanni

Durata: 2006-2008

Parole chiave: nanotecnologie; mutazioni; p53; diagnostica

Altri Enti coinvolti: D'Appolonia S.p.A. (G.L. Vezzani); Technische Universiteit Delft, TUD, The Netherlands (R. Lindken); LaVision GMBH, LAV, Germany (U. Dierksheide); LaVision BioTec GMBH, LVBT, Germany (M. Schutte); Danmarks Tekniske Universitet, Department of Micro and Nanotechnology, MIC, Denmark (H. Bruus); Institut fuer Mikrotechnik Mainz GMBH, IMM, Germany (F. Schoenfeld); Uppsala Universitet, UPU, Sweden (A.C. SyvSnen)

Tipologia progetto: tecnologie abilitanti

Area di interesse: diagnostica

Soggetti cofinanziatori: Commissione Europea

Background

Il completamento della sequenza del genoma umano ha aperto la possibilità di sviluppare nuovi saggi diagnostici diretti alla individuazioni di danni molecolari responsabili o predisponenti allo sviluppo di patologie oncologiche e non oncologiche e della risposta ai farmaci. Le tecnologie necessarie per identificare questi danni sono complesse, difficilmente automatizzabili, soggette ad errori di procedura e di interpretazione e devono essere effettuate da

Consuntivo progetti RC 2006-2008

personale specializzato. Per tale motivo lo sviluppo di sistemi diagnostici automatizzati e affidabili potrebbe avere importanti ricadute in campo biomedico.

Le nanotecnologie e la interazione tra gruppi con competenze diversificate e multidisciplinari (ingegneri, fisici, matematici, biologi e medici) offre la possibilità di sviluppare sistemi diagnostici altamente innovativi e in questa ottica il progetto internazionale SMART-BioMEMS si pone tra le attività di "frontiera" con ricaduta a breve termine nel campo sanitario.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Il progetto SMART-BioMEMS si propone di sviluppare un "microlaboratorio" (dimensioni previste 1.5 x 1.0 cm) (Lab-on-a-Chip) che abbia integrate le funzionalità di preparazione dei campioni, amplificazione, analisi e interpretazione dei dati diretto alla ricerca rapida di alterazioni geniche associate ad una determinata patologia. I più recenti sviluppi delle tecnologie MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) permette di utilizzare nanoquantità di reagenti riducendo enormemente il costo per singolo saggio biologico.

Beneficiari

Comunità scientifica, potenziali applicazioni diagnostiche in collaborazione con PMI.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Il prototipo è stato assemblato al MIC (Copenhagen, DK) ed è iniziata la validazione dello strumento e dei risultati ottenuti utilizzando il materiale biologico e i controlli di qualità definiti nel nostro laboratorio. Nel corso di questi saggi abbiamo evidenziato una deviazione della omogeneità della temperatura nelle microcamere di reazione tale da ridurre l'efficienza del sistema al di sotto delle specifiche imposte. Per tale motivo è stato necessario modificare il disegno del sistema di controllo della temperatura di una delle camere e ridisegnare l'housing e l'assemblaggio del sistema. A seguito di questa attività addizionale la Comunità Europea ha proposto un allungamento di quattro mesi del progetto la cui conclusione è prevista per Marzo 2009.

Studio del ruolo immunosoppressorio del recettore CTLA-4 e del suo possibile utilizzo come "target" per l'induzione di apoptosi di cellule tumorali

Linea di ricerca: 2 - Interazioni ospite-tumore

Programma: c - Alterazioni dell'immunità innata associata ai tumori e meccanismi di sovversione delle risposte antitumorali

Responsabile: Maria Pia Pistillo

Partecipanti: Anna Morabito, Stefania Laurent, Giuseppe Balbi

Durata: 2006-2008

Parole chiave: CTLA-4; immunosoppressione; apoptosi; tumori solidi ed ematologici

Altre strutture IST: S.C. Epidemiologia Clinica (B. Dozin); S.C. Immunologia (M.C. Mingari); S.C. Terapia Immunologica (S. Ferrini, M. Fabbì); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini, S. Salvi); Oncologia Medica A (P. Queirolo)

Altri Enti coinvolti: Dip. Patologia, Università di Verona (M. Colombatti); Dip. Scienze Anatomiche Umane, Università di Bologna (A. Martelli); Dip. Patologia Umana, Università di Messina (G. Ferlazzo); Clinica Ematologica, DIMI, Università di Genova (M. Gobbi); St. Marianna University School of Medicine, Kanagawa, Japan (T. Kato)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Fondazione CARIGE; Fondazione CARIVE; Regione Liguria; A.O. San Martino di Genova

Background

CTLA-4 (o CD152) è un recettore di membrana omodimerico che agisce da regolatore negativo dell'attivazione linfocitaria T. Esercita la sua azione inibitoria, sulla secrezione di citochine e progressione del ciclo cellulare, dopo interazione con i ligandi CD80/CD86 espressi sulle cellule presentanti l'antigene. Crescenti evidenze attribuiscono al CTLA-4 un ruolo più ampio di attenuatore immune che può agire anche in altri contesti cellulari. Abbiamo in precedenza dimostrato che CTLA-4, oltre che sui linfociti T, è espresso anche in linee cellulari derivate sia da tumori solidi di vario istotipo, tra cui carcinoma mammario, ovarico e melanoma, (Contardi E. et al. Int J Cancer 117:538,2005), sia da neoplasie ematologiche (Pistillo M.P. et al. Blood 101:202,2003). Il CTLA-4 espresso da tali cellule è funzionalmente attivo in quanto capace di trasdurre un segnale apoptotico dopo trattamento con i suoi ligandi ricombinanti CD80/CD86. Il CTLA-4 espresso sulle cellule tumorali potrebbe svolgere lo stesso ruolo soppressorio della risposta immune che gli è stato attribuito quando è espresso sulle cellule T attivate e sulle Tregs, contribuendo quindi ai meccanismi di "escape" del tumore dalla sorveglianza immunitaria. L'espressione del CTLA-4 è stata recentemente evidenziata anche nei melanociti epidermici e in tessuti di melanoma primario (Shah K et al. J Invest Dermatol 128:2870;2008) suggerendo quindi un suo possibile ruolo nella biologia del melanoma ed un "targeting" terapeutico

Consuntivo progetti RC 2006-2008

diretto sul tumore. Emergono infatti nuove possibilità per il meccanismo d'azione degli anticorpi bloccanti il CTLA-4 (ipilimumab, tremelimumab) attualmente impiegati nel nostro Istituto nell'immunoterapia del melanoma metastatico.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale del progetto è stato lo studio del ruolo del CTLA-4 nell'immuno-evasione tumorale e nella prospettiva di un suo possibile utilizzo terapeutico. Le fasi in cui il progetto si è articolato hanno riguardato l'analisi dell'espressione e funzione del CTLA-4 sia in cellule tumorali, da neoplasie ematologiche e solide, sia in cellule della risposta immune innata, quali le cellule dendritiche. In entrambi i tipi cellulari sono stati indagati gli effetti funzionali indotti dal trattamento con anticorpi anti-CTLA-4 agonisti e il possibile ruolo del CTLA-4 come target per l'induzione di apoptosi cellulare e per l'inibizione di citochine pro-angiogeniche e pro-infiammatorie.

Beneficiari

I risultati della ricerca possono avere risvolti applicativi per i pazienti oncologici sulla base delle nuove conoscenze di tipo immunologico, acquisite con lo studio del CTLA-4 nelle varie neoplasie. In particolare i dati biologici prodotti potranno essere finalizzati da un lato a migliorare la comprensione dei meccanismi con cui il tumore evade la sorveglianza immunitaria e dall'altro a fornire nuove acquisizioni sui meccanismi di azione di alcuni farmaci biologici a bersaglio molecolare impiegati ad esempio nell'immunoterapia del melanoma.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Abbiamo evidenziato l'espressione del recettore CTLA-4 su linee cellulari e colture tumorali primarie di vario istotipo (carcinoma mammario, ovarico, prostatico e melanoma) sia al livello proteico con tecniche citofluorimetriche sia al livello trascrizionale con tecniche di PCR quantitativa (Real-Time). In tali tipi cellulari abbiamo analizzato l'induzione di apoptosi indotta sia da anticorpi scFv anti-CTLA-4 (prodotti precedentemente nel nostro laboratorio) sia dai ligandi del CTLA-4, CD80 e/o CD86, utilizzati in forma ricombinante solubile. L'induzione di apoptosi è stata analizzata in citofluorimetria mediante saggio con Annessina V e propidio ioduro. È stato caratterizzato il meccanismo molecolare del "pathway" apoptotico estrinseco indotto dal CTLA-4 evidenziando l'attivazione della caspasi-8 apicale e della caspasi-3 effettrice. Il trattamento delle linee di carcinoma mammario, ovarico e di melanoma con anticorpi anti-CTLA-4 in grado di attivare le vie di trasduzione del segnale inibitorio CTLA-4-mediato mimando gli effetti dei suoi ligandi naturali, ha portato a downmodulazione della proliferazione cellulare e della secrezione di citochine pro-infiammatorie e pro-angiogeniche.

L'analisi di espressione e funzione del CTLA-4 è stata estesa alle neoplasie ematologiche dimostrando che il trattamento con i ligandi naturali di CTLA-4 induce una rapida risposta apoptotica anche in cellule leucemiche ottenute da pazienti con leucemia acuta mieloide (AML), sia alla diagnosi che in fase di chemioresistenza. Ciò è risultato in accordo col fatto che entrambi i tipi di cellule leucemiche mostrano simile espressione di CTLA-4 al livello proteico e trascrizionale, indipendente dalle caratteristiche cliniche e dal regime chemioterapico dei pazienti. Lo stesso "pathway" apoptotico indotto da CTLA-4 nei tumori solidi è stato confermato nelle neoplasie ematologiche. Questo studio ha fornito la prima evidenza che il "targeting" di CTLA-4 può portare all'uccisione di cellule neoplastiche AML suggerendo la possibilità di un valido approccio terapeutico per ovviare ai fenomeni di chemioresistenza nell'AML.

L'analisi di espressione e funzione del CTLA-4 è stata condotta anche in cellule dendritiche (DC) sottoposte a vari stimoli maturativi. Tali studi hanno fornito la prima evidenza di espressione del CTLA-4 su DC derivate in vitro da monociti umani attivati. Esperimenti funzionali hanno dimostrato che la maturazione fenotipica delle DC non viene influenzata dal trattamento con anticorpi anti-CTLA-4 agonisti mentre tale trattamento ne riduce la secrezione di citochine e l'abilità stimolante la proliferazione cellulare T in risposta a stimolazione antigenica. Il CTLA-4 sulle DC può quindi mediare segnali inibitori e rappresentare un nuovo meccanismo regolatorio per la terminazione della risposta immune T-mediata.

Elenco pubblicazioni:

Laurent S.-Palmisano G.-Martelli A.-Kato T.-Tazzari P.-Pierri I.-Clavio M.-Dozin B.-Balbi G.-Megna M.-Morabito A.-Lamparelli T.-Bacigalupo An.-Gobbi M.-Pistillo M.P.

CTLA-4 expressed by chemoresistant, as well as untreated, myeloid leukaemia cells can be targeted with ligands to induce apoptosis.

Br. J. Haematol. 136:597/608, 2007

Laurent S.-Carrega P.-Saverino D.-Mortasa L.-Mingari M.C.-Ferlazzo G.-Pistillo M.P.

CTLA-4 is expressed by human monocyte-derived dendritic cells and its ligation decreases cytokine secretion and T cell proliferation stimulating ability.

J. Immunol., submitted

Presentazione a convegni:

Palmisano GL.-Tazzari PL.-Martelli A.-Falà F.-Fabbi M.-Kato T.-Lucarelli E.-Polito L.-Bolognesi A.-Ricci F.-Salvi S.-Mantero S.-Pistillo M.P.

Targeting CTLA-4 by its recombinant ligands CD80/CD86: perspectives towards the development of a novel anti-tumor therapeutic approach.

Third International Conference on Translational Research and Pre-Clinical Strategies in Radiation Oncology, Lugano, 12-15 Marzo, 2006. Radiother. Oncol. 78 (suppl. 1):S63, 2006

Laurent S.-Palmisano GL.-Martelli AM.-Kato T.-Tazzari PL.-Pierri I.-Clavio M.-Balbi G.-Megna M.-Morabito A.-Lamparelli T.-Bacigalupo A.-Gobbi M.-Pistillo M.P.

Targeting the costimulatory molecule CTLA-4 to induce apoptosis of chemoresistant acute myeloid leukemia cells.

VII Meeting of Molecular Oncology, Positano, 14-17 Maggio 2007

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Laurent S.-Palmisano GL.-Martelli AM.-Kato T.-Tazzari PL.-Pierri I.-Clavio M.-Dozin B.-Balbi G.-Megna M.-Morabito A.-Lamparelli T.-Bacigalupo A.-Gobbi M.-Pistillo M.P.

CTLA-4 expressed by chemoresistant, as well as untreated, myeloid leukemia cells can be targeted with ligands to induce apoptosis.

12th Congress of the European Hematology Association Vienna, Austria, 7-10 Giugno 2007. Haematologica 92(suppl. 1):174, 2007

Laurent S.-Carrega P.-Saverino D.-Boitano M.-Camoriano M.-Morabito A.-Mingari M.C.-Ferlazzo G.-Queirolo P.-Pistillo M.P.

CTLA-4 is expressed by melanoma primary cultures and its ligation can downmodulate cell proliferation and cytokine secretion.

Comunicazione al 14° Congresso Annuale Intergruppo Melanoma Italiano (IMI). Roma, 13-15 Novembre 2008

Alterazioni genetiche ed epigenetiche come indicatori di prognosi e di risposta al trattamento in neoplasie dell'adulto e pediatriche

Linea di ricerca: 3 – Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

Programma: a – Caratterizzazione del paziente con diagnostica convenzionale e biologica finalizzata all'ottimizzazione del trattamento

Responsabile: Massimo Romani

Partecipanti: Claudio Brigati, Ida Casciano, Angela Di Vinci, Giorgio Allemanni

Durata: 2006-2008

Parole chiave: epigenetica; follow up; fattori prognostici; indicatori di risposta alla terapia

Altre strutture IST: S.C. Oncologia Medica A (G. Gardin, F. Grossi, L. Del Mastro); S.S. Tumori Polmonari (P. Russo); S.S. Oncologia Traslazionale Pediatrica (G.P. Tonini); S.S. Radioterapia Infantile e Tecniche Speciali (S. Barra); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M.B. Gatteschi)

Altri Enti coinvolti: Anatomia e Citoistologia Patologica, A.O. San Martino, Genova (J.L. Ravetti); Clinica Neurochirurgia, Università di Genova (G.L. Zona); Istituto G. Gaslini, Genova (B. De Bernardi); Anatomia Patologica, Università di Varese (F. Sessa); Chirurgia Toracica, Università Insubria, Varese (L. Dominioni)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica sperimentale

Area di interesse: diagnostica

Soggetti cofinanziatori: AIRC; Fondazione CARIGE; Regione Liguria; Associazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma

Background

Il cancro è una malattia genetica ed epigenetica. L'ereditarietà definita come "genetica" è basata sulla sequenza del genoma e rappresenta l' "impronta digitale" dell'organismo mentre l'ereditarietà epigenetica determina il "dove, come e quando" devono essere utilizzate le informazioni genetiche regolando la funzionalità dei geni.

La metilazione è un modificazione epigenetica che interessa le "isole CpG", cioè regioni con un elevata densità di doppietti CG. Le isole CpG funzionalmente rilevanti sono quelle che si trovano in prossimità delle regioni promotrici di geni e la loro metilazione può interferire sull'espressione genica. La metilazione è considerata in campo oncologico come un meccanismo di inattivazione genica alternativo a mutazioni o delezioni.

In questi ultimi anni è stata precisamente determinata l'importanza della metilazione aberrante del DNA, come indicatore di prognosi e come predittore della risposta alla terapia. Questi risultati sono stati validati in numerosi studi clinici ed è prevedibile che l'epigenetica divenga in tempi molto brevi un valido complemento ai sistemi "classici" di inquadramento diagnostico e prognostico del paziente.

Il nostro gruppo si occupa da diversi anni di alterazioni epigenetiche in tumori e il presente progetto di ricerca era diretto al trasferimento in clinica di tecnologie e know how sviluppati per applicazioni precliniche.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo principale del progetto è quello di fornire dati direttamente utilizzabili nella gestione del paziente relativamente a prognosi, follow up, sensibilità a specifiche terapie.

Le problematiche affrontate durante il triennio 2006-2008 sono state direttamente dipendenti dalla patologia tumorale presa in considerazione pertanto, all'interno dei tre macro-obiettivi sopra indicati, sono stati individuati obiettivi specifici diretti a rispondere a precisi problemi biomedici.

- Neuroblastoma: studio dell'impatto del profilo di metilazione sulla predizione della progressione di malattia e sulla stratificazione dei pazienti in classi di rischio.

- Tumori cerebrali: a) gliomi: valutazione di profili di metilazione come predittori di risposta alla terapia con agenti alchilanti, b) meningiomi: identificazione di marcatori epigenetici in grado di distinguere le forme sporadiche da quelle ad alto rischio di recidiva.

- Tumori polmonari: definizione del ruolo della metilazione ed espressione del gene p73 in carcinomi polmonari.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

- Leucemie e linfomi: studio dei meccanismi di regolazione di geni coinvolti nella leucemogenesi e nella risposta immunitaria.
- Innovazione tecnologica: a) tumori mammari: sviluppo di metodologie per la quantificazione del numero di copie di HER2 su tumore sul DNA tumorale circolante, b) identificazione di marcatori epigenetici nel DNA circolante per la diagnosi precoce ed il follow up di pazienti

Beneficiari

Comunità scientifica e Servizio Sanitario Nazionale.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

- Neuroblastoma: è stata dimostrata, per la prima volta, l'importanza del livello di metilazione (e non della semplice presenza di sequenze target mutilate) come predittore di outcome in pazienti in stadio avanzato e definiti, secondo i parametri classici, ad "alto rischio". Le soglie di metilazione identificate per mezzo di saggi quantitativi, a differenza di quanto fatto fino ad ora, sono da considerarsi come valori oggettivi e tali da poter essere trasferiti alla pratica clinica per una più precisa stratificazione dei pazienti in classi di rischio e per ottimizzare le scelte terapeutiche.
- Tumori cerebrali: a) gliomi - il reclutamento dei pazienti per definire il valore della metilazione di geni coinvolti nella riparazione del DNA nella risposta ad agenti alchilanti terminerà nel 2009. Nel triennio 2006-2008 si è proceduto a determinare, come servizio di supporto clinico, lo stato di metilazione di MGMT quale predittore di outcome e di risposta al Temozolomide; b) meningiomi - Attraverso l'analisi quantitativa è stato dimostrato che il livello di metilazione del gene XIAP1 (un inibitore della apoptosi) è significativamente inferiore nei meningiomi recidivanti rispetto agli sporadici ($p = 0.0097$) mentre non si osservano differenze nella dura madre circostante la lesione ($p = 0.40$)
- Tumori polmonari: il gene target di questo studio è stato p73 (un membro della famiglia di p53 con diverse varianti che posseggono funzioni opposte di oncogene e antioncogene). In questo studio abbiamo dimostrato che nelle cellule tumorali la forma oncogenica DeltaNp73 è espressa e correttamente localizzata nel nucleo cellulare dove può esercitare le sue funzioni fisiologiche di molecola antiapoptotica. Al contrario, la variante apoptotica e antioncogenica TAp73, anche se espressa, è sequestrata principalmente nel citoplasma dove non può esercitare le sue funzioni di fattore trascrizionale.
- Leucemie e linfomi: a) sono stati studiati in dettaglio i meccanismi epigenetici che controllano l'espressione di antigeni di classe II nel lineage mielomonocitico ed è stata dimostrata l'importanza della metilazione del promotore IV di CIITA nel blocco della induzione della espressione degli antigeni HLA-II; b) è stato studiato il ruolo dei geni della famiglia DLX in B-ALL pediatriche ed è stato dimostrato che il gene DLX3 è silenziato da ipermetilazione in un subset di B-ALL con un fenotipo particolarmente aggressivo aprendo la possibilità di utilizzare questo marcatore per la genotipizzazione delle B-ALL.
- Innovazione tecnologica: a) tumori mammari - è stato sviluppato un metodo di quantificazione assoluta del numero di copie del gene HER2 da affiancare alla determinazione mediante FISH in casi di dubbia interpretazione. E' iniziato uno studio clinico per individuare l'amplificazione di HER2 nel DNA tumorale circolante in pazienti recidivanti il cui tumore primitivo era non amplificato. E' noto che circa il 20% delle pazienti HER2-singola copia, in caso di recidiva presentano amplificazione e sono eleggibili per il trattamento con Trastuzumab. La validazione del nostro metodo permetterebbe di individuare queste pazienti con facilità con metodiche non invasive; b) marcatori epigenetici nel DNA circolante - è stata sviluppata una tecnologia che permette di determinare lo stato di metilazione di almeno 30 sequenze target differenti nel DNA tumorale circolante a partire da 500 microlitri di sangue intero per mezzo di amplificazione con primers degenerati che riconoscono le sequenze metilate e quelle non metilate. Tale tecnologia è stata messa a punto nell'ottica di sviluppare saggi diagnostici non invasivi per il monitoraggio della risposta alla terapia e per la diagnostica precoce di neoplasie.

Elenco pubblicazioni:

Di Vinci A.-Gelvi I.-Banelli B.-Casciano I.-Allemanni G.-Romani M.

Meth/DOP/PCR: an assay for the methylation profiling of trace amounts of DNA extracted from bodily fluids. Lab. Invest. 86:297/303, 2006

Campo Dell'orto M.-Banelli B.-Giarin E.-Accordi B.-Trentin L.-Romani M.-Te Kronnie G.-Basso G.

Down regulation of DLX3 expression in MLL/AF4 childhood lymphoblastic leukemias is mediated by promoter region hypermethylation. Oncol. Rep. 18:417/423, 2007

De Lerma Barbaro A.-De Ambrosio A.-Banelli B.-Li Pira G.-Aresu O.- Romani M.-Ferrini S.-Accolla R.

Methylation of CIITA promoter IV causes loss of HLA/II inducibility by IFN(gamma) in promyelocytic cells. Int. Immunol. 20:1457/1466, 2008

Di Vinci A.-Sessa F.-Casciano I.-Banelli B.-Franzi F.-Brigati C.-Allemanni G.-Russo P.-Dominioni L.-Romani M.

Different intracellular compartmentalization of TA and deltaNp73 in non-small cell lung cancer. Int. J. Oncol., in press

Banelli B.-Bonassi S.-Casciano I.-Mazzocco K.-Di Vinci A.-Scaruffi P.-Brigati C.-Allemanni G.-Borzi L.-Tonini G.P.-Romani M.

Quantitative analysis identifies a threshold level of DNA methylation in the 14.3.3σ gene predictive of outcome in advanced stage, high-risk, neuroblastic tumor patients. J. Natl. Cancer Inst., submitted

Presentazione a convegni:

Di Vinci A.-Sessa F.-Casciano I.-Banelli B.-Franzi F.-Brigati C.-Allemanni G.-Russo P.-Dominioni L.-Romani M.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Different intracellular compartmentalization of TA and deltaNp73 in non-small cell lung cancer.
Gordon Research Conference "Cancer Genetics and Epigenetics", Lucca, 20-25 maggio 2007

Romani M.

A DNA Methylation Profile Predicts Outcome In Advanced Stage, High-Risk, Neuroblastoma Patients.
Congresso SIC, Pordenone 25-27 Novembre 2007

Banelli B.-Bonassi S.-Casciano I.-Mazzocco K.-Di Vinci A.-Scaruffi P.-Brigati C.-Allemanni G.-Borzì L.-Tonini G.P.-Romani M.

A DNA Methylation Profile Predicts Outcome In Advanced Stage, High-Risk, Neuroblastoma Patients.
Advances in Neuroblastoma Research 2008, Chiba, Japan, May 21-24, 2008

Casciano I.-Romani M.-Carli F.-Salvi S.-Boccardo S.-Levaggi A.-Giraudi S.-Taveggia P.-Bini G.-Del Mastro L.

Novel approach for copy number analysis of Her2/neu in breast carcinoma by Quantitative RealTime Polymerase Chain Reaction.

X Congresso AIOM, Verona 11-14 ottobre 2008

Studio di molecole regolatrici della risposta immune come parametri prognostici e predittivi l'efficacia di terapie antineoplastiche

Linea di ricerca: 3 – Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

Programma: c – Identificazione di indicatori di risposta ai trattamenti

Responsabile: Maria Pia Pistillo

Partecipanti: Anna Morabito, Stefania Laurent, Giuseppe Balbi, Marta Camoriano

Durata: 2006-2008

Parole chiave: downregolazione HLA; genotipi CTLA-4; tumori solidi ed ematologici; immunoterapie

Altre strutture IST: S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (F. Carli, S. Salvi); S.C. Oncologia Medica A (L. Del Mastro, P. Queirolo); S.C. Epidemiologia Clinica (P. Bruzzi, B. Dozin); S.C. Oncologia Medica C (P. Piccioli)

Altri Enti coinvolti: Dip. di Emato-Oncologia, A.O.U. San Martino, Genova (A. Bacigalupo); Ematologia Oncologica Pediatrica, Istituto G. Gaslini, Genova (E. Lanino); DIMI e DOBIG, Università di Genova (F. Indiveri, M. Gobbi); Policlinico S. Orsola, Bologna (G. Pasquinelli/P. Tazzari); Istituto Toscano Tumori, Firenze (R. Notaro); Ospedale Sant'Andrea, La Spezia

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica osservazionale

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Fondazione CARIGE, Ministero della Salute, Regione Liguria, A.O.U. San Martino di Genova

Background

La ricerca si è focalizzata su due fattori regolatori della risposta immune antitumorale che sono a) gli antigeni del sistema HLA di classe I e b) il recettore inibitorio CTLA-4, al fine di valutarne il possibile impatto come marcatori prognostici e/o predittivi di risposta alle terapie antineoplastiche.

a) Gli antigeni HLA di classe I presentano peptidi antigenici tumorali ai linfociti T citotossici che lisano il tumore, per cui la loro mancata o ridotta espressione è stata proposta come meccanismo di evasione tumorale dalla sorveglianza immunitaria. L'80% dei tumori mammari mostra perdita completa o parziale degli antigeni HLA di classe I e i pochi dati di correlazione tra perdita dell'HLA e outcome della malattia sono contrastanti e non conclusivi. Inoltre, recenti studi suggeriscono una corretta espressione HLA di classe I come prerequisito per la risposta al trattamento di tumori, overesprimenti il recettore HER-2, con immunoterapie che impiegano anticorpi monoclonali anti-HER-2 (trastuzumab) o vaccinazione con peptidi HER2-derivati.

Tra le attività inerenti l'HLA, il Laboratorio ha gestito la Banca ECBR, collezione di linee cellulari B linfoblastoidi HLA-tipizzate, utili per le attività di centri che operano nel campo dei trapianti d'organo e midollo osseo, di malattie autoimmuni e di ricerca immunologica ed oncologica.

b) CTLA-4 è un recettore inibitorio dei linfociti T con funzione soppressoria della risposta immune T-mediata. Alcuni polimorfismi genici del CTLA-4, responsabili della sua ridotta funzionalità, sono stati correlati con le malattie autoimmuni, con l'esito di trapianti allogenici e con alcuni marcatori prognostici del carcinoma mammario (Ghaderi A. et al. Breast Cancer Res Treat. 2004; Erfani N. et al. Cancer Genet Cytogenet. 2006). Tali polimorfismi sono inoltre risultati importanti fattori predittivi di risposta all'immunoterapia con anticorpi anti-CTLA-4 nel melanoma metastatico.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale del progetto è stato lo studio della downregolazione HLA di classe I e dei polimorfismi genici del CTLA-4, come marcatori molecolari prognostici o predittivi di risposta alle terapie antineoplastiche. Lo studio sull'HLA è stato condotto in una casistica retrospettiva di pazienti di carcinoma mammario e quello sui polimorfismi genici del

Consuntivo progetti RC 2006-2008

CTLA-4 in pazienti leucemici trapiantati con cellule staminali emopoietiche presso il Centro Trapianti di Midollo Osseo del San Martino (Dr. A. Bacigalupo) e in pazienti affetti da sclerodermia (SSc) del DIMI (Prof. F. Indiveri). Obiettivo secondario è stata la messa a punto delle metodologie per identificare i polimorfismi genici del CTLA-4 da impiegarsi in studi successivi in pazienti affetti da carcinoma mammario e melanoma metastatico in trattamento con immunoterapia presso l'IST.

Beneficiari

I risultati della ricerca possono avere risvolti applicativi per le pazienti con carcinoma mammario sulla base delle conoscenze acquisite con lo studio della downregolazione HLA in quanto i dati biologici forniti potranno aiutare a definire con maggior precisione la prognosi e a ottimizzare un eventuale trattamento immunoterapeutico. I risultati possono inoltre contribuire a migliorare la comprensione dei meccanismi con cui il tumore evade la sorveglianza immunitaria al fine di ottimizzare trattamenti immunoterapici la cui efficacia coinvolge il corretto funzionamento del sistema HLA di classe I.

I risultati acquisiti sui polimorfismi genici potranno essere utilizzati in campo trapiantologico in quanto potranno fornire la base per migliorare la selezione del donatore più compatibile per l'allogranto con cellule staminali emopoietiche, ridurre l'insorgenza di GvHD acuta e incrementare la sopravvivenza a lungo termine dei pazienti trapiantati.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

A) Sistema HLA. E' stata analizzata l'espressione dell'HLA di classe I totale e delle sue subunità, catena pesante alfa e beta-2 microglobulina (beta-2m), mediante immunostochimica, in tumori mammari di 67 pazienti retrospettive dell'IST (protocollo RTA06.001). I risultati sono stati correlati con i fattori prognostici noti e dati clinici di follow up. La downregolazione HLA totale è stata osservata nel 76% dei tumori, mentre quella della catena alfa e beta-2m rispettivamente nel 57% e 46% dei tumori. E' stata trovata un'associazione statisticamente significativa tra downregolazione HLA e i fattori: assenza di necrosi tumorale, di invasione linfovascolare ed età inferiore a 60 anni. Inoltre la downregolazione della beta-2m è stata associata significativamente ad un aumento della sopravvivenza globale (curve di Kaplan-Meyer) nelle pazienti con linfonodi positivi. Questi risultati correlano con il ruolo della beta-2m nel regolare la crescita delle cellule tumorali.

Abbiamo inoltre partecipato a studi collaborativi con altri gruppi di ricerca del Policlinico S.Orsola di Bologna (Dr. Pasquinelli/Tazzari) e dell'Ospedale Sant'Andrea di La Spezia (Dr. Fedeli/Roncella) sull'espressione HLA di classe I in trapianti allogeneici di cellule endoteliali vasali e sulla determinazione di micrometastasi nei versamenti pleurici di pazienti con tumore mammario mediante amplificazione del trascritto del gene mammoglobina.

Abbiamo partecipato al 14° (2006) e 15° (2008) "International HLA and Immunogenetics Workshop" per la componente "HLA expression and cancer", come laboratorio italiano di riferimento per il controllo di qualità esterno sull'analisi dell'espressione HLA di classe I nel melanoma (vedi report su Tissue Antigens).

Nell'ambito delle attività inerenti la Banca di linee cellulari ECBR, si è proceduto alla validazione in citofluorimetria dell'espressione di molecole HLA di classe I su linee cellulari murine transfettate con singoli alleli HLA. Il laboratorio ha distribuito complessivamente 29 linee cellulari a vari enti di ricerca: Harvard Medical School di Boston (USA), Istituto G. Gaslini di Genova, Istituto Tumori Toscano (ITT) di Firenze e Laboratori IST (S.C. Terapia Immunologica, S.C. Immunologia).

B) CTLA-4: in collaborazione con la S.C. Oncologia Medica C (Dr.ssa P. Piccioli) e l'ITT di Firenze (Dr. R. Notaro), è stata messa a punto la tecnica molecolare di Multiplex Tetra-Primer ARMS-PCR (T-ARMS-PCR) per la determinazione dei polimorfismi genici del CTLA-4 SNPs: -318C>T (promotore), +49A>G (esone-1) e CT60 (3'UTR). Tale metodologia di genotipizzazione è stata impiegata in studi di associazione dei polimorfismi CTLA-4 con la suscettibilità alla sclerodermia (SSc) in cui è stato evidenziato il ruolo significativo del polimorfismo CTLA-4 -318 C>T nella forma clinica di SSc senza concomitante Tiroidite di Hashimoto.

La genotipizzazione del CTLA-4 è stata anche effettuata in 133 coppie di donatori e di riceventi sottoposti, per neoplasie ematologiche, a trapianto di cellule staminali da fratello HLA-identico presso il Centro Trapianti di Midollo Osseo di San Martino (Dr. A. Bacigalupo). La frequenza dei tre polimorfismi di CTLA-4, sia nei donatori sia nei riceventi, è stata correlata con l'outcome del trapianto: GvHD (acuta e cronica), sopravvivenza globale (OS) e libera da malattia (DFS), ricaduta.

La presenza nei riceventi dell'allele G del polimorfismo +49A>G è risultata significativamente associata all'aumento della OS, della DSF e alla riduzione della frequenza di ricadute. L'analisi multivariata (regressione di Cox) ha confermato il significato prognostico indipendente per l'OS e per la DFS del polimorfismo +49A>G del ricevente ma non quello del donatore. I polimorfismi -318C>T e CT60A>G (donatore e ricevente) e il polimorfismo +49A>G (donatore) non sono risultati associati all'outcome del trapianto.

Elenco pubblicazioni:

Balbi G.-Ferrera F.-Rizzi M.-Piccioli P.-Morabito A.-Cardamone L.-Ghio M.-Palmisano G.-Carrara P.-Pedemonte S.-Sessarego M.- De Angioletti M.-Notaro R.-Indiveri F.-Pistillo M.P.

Association of -318 C/T and +49 A/G cytotoxic T lymphocyte antigen/4 (CTLA/4) gene polymorphisms with a clinical subset of italian patients with systemic sclerosis.

Clin. Exp. Immunol. 149:40/47, 2007

Pasquinelli G.-Pistillo M.P.-Ricci F.-Buzzi M.-Tazzari P.-Feroni L.-Manferdini C.-Ceccarelli C.-Stella A.-Conte R.

The in situ expression of human leukocyte antigen class I antigens is not altered by cryopreservation in human arterial allografts.

Cell Tissue Bank. 8:195/203, 2007

Piccioli P.-Serra M.-Pedemonte S.-Balbi G.-Loiacono F.-Lastraioli S.-Gargiulo L.-Morabito A.-Zuccaro D.-Del Mastro L.-Pistillo M.P.-Venturini M.-De Angioletti M.-Notaro R.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Hexaprimer amplification refractory mutation system PCR for simultaneous single tube genotyping of 2 close polymorphisms. Letter.
Clin. Chem. 54:227/229, 2008

Roncella S.-Ferro P.-Bacigalupo B.-Dessanti P.-Pronzato P.-Franceschini M.-Prattico' L.-Carletti A.-Canessa P.-Fontana V.-Fais F.-Pistillo M.P.-Fedeli F.
Assessment of RT/PCR detection of human mammaglobin for the diagnosis of breast cancer derived pleural effusions.
Diagn. Mol. Pathol. 17:28/33, 2008

Morabito A.-Dozin B.-Salvi S.-Pasciucco G.-Balbi G.-Laurent S.-Pastorino S.-Carli F.-Truini M.-Bruzzi P.-Del Mastro L.-Pistillo M.P.
Expression and clinical relevance of HLA Class I, heavy chain and β 2-microglobulin down-regulation in breast cancer.
Human Immunol., submitted

Piccioli P.-Balbi G.-Serra M.-Morabito A.-Lamparelli T.-Gobbi M.-Laurent S.-Dozin B.-Bruzzi P.-Bacigalupo A.-Notaro R.-Pistillo M.P.
CTLA-4 +49 A>G polymorphism of recipients of HLA-matched sibling allogeneic stem cell transplantation is associated with survival and relapse incidence.
Biol Blood Marrow Transplant, submitted

Presentazione a convegni:

Balbi G.-Palmisano G.L.-Morabito A.-Piccioli P.-Notaro R.-Rizzi M.-Ferrera F.-Indiveri F.-Pistillo M.P.
Analysis of CTLA-4 genetic polymorphisms in Italian sclerodermic patients.
Comunicazione al Congresso "Skin, Rheumatism and Autoimmunity", Abano Terme 2-4 Febbraio 2006. Clinical and Experimental Rheumatology. Vol.24 suppl. 40, OP12 pg.S90, 2006

Balbi G.-Ferrera F.-Rizzi M.-Piccioli P.-Morabito A.-Cardamone L.-Ghio M.-Palmisano G.-Carrara P.-Notaro R.-Indiveri F.-Pistillo M.P.
Genetic polymorphisms of CTLA-4 gene in Italian patients with systemic sclerosis.
Comunicazione all'International Workshop on Systemic Sclerosis "Gene-polymorphisms, clinical variants and response to therapy", Milano 7-10 Marzo 2007

Gorji N.-Ferro P.-Franceschini M.C.-Bacigalupo B.-Dessanti P.-Giannico A.-Moroni M.-Pietra L.-Pistillo M.P.-Roncella S.-Fedeli F.
Statistical analysis of RT-PCR hMAM detection for diagnosis of pleural effusion from breast cancer patients.
Poster al IV° Congresso Nazionale di Anatomia Patologica (SIAPEC). Milano, 5-9 ottobre 2007. Patologica Vol. 99 – N.4, 2007

S. F. Chew, C. Kanaan and B. D. Tait. On behalf of the six participating laboratories : Ferrone (USA), Garrido (Spain), Pistillo (Italy), Tait (Australia), Tilanus (Netherlands), Worsham (USA). HLA expression and cancer – 14th IHIWS immunohistochemistry quality control exercise exchange results. Tissue Antigens 69 s1:248-251,2007.

Roncella S.-Ferro P.-Bacigalupo B.-Pronzato P.-Franceschini M.-Prattico' L.-Carletti A.-Canessa P.-Fontana V.-Pistillo M.-Fedeli F.
Assessment of RT-PCR detection of human mammaglobin for the diagnosis of breast cancer derived pleural effusions.
J Clin Oncol 26 (May 20 suppl: abstr 1112), 2008

Piccioli P.-Balbi G.-Serra M.-Morabito A.-Lamparelli T.-Gobbi M.-Laurent S.-Dozin B.-Bruzzi P.-Bacigalupo A.-Pistillo M.P.-Notaro R.
CTLA-4+49 A>G polymorphism of recipient of HLA-matched sibling allogeneic stem cell transplantation is associated with survival and relapse incidence.
International Symposium on Cancer genotypes and Cancer phenotypes. Firenze, 4-5 luglio 2008

Piccioli P.-Balbi G.-Serra M.-Morabito A.-Lamparelli T.-Gobbi M.-Laurent S.-Dozin B.-Bruzzi P.-Bacigalupo A.-Notaro R.-Pistillo M.P.
CTLA-4+49 A>G polymorphism of recipient of HLA-matched sibling allogeneic stem cell transplantation is associated with survival and relapse incidence.
X Congress of the Italian Society of Experimental Hematology (SIES). Bari, 24-26 settembre 2008

Truini M.-Salvi S.-Ferro P.-Boccardo S.-Franceschini M.C.-Pistillo M.P.-Gorji N.-Dessanti P.-Bacigalupo B.-Fedeli F.-Roncella S.
Evaluation of Her-2/neu expression and gene amplification in human pancreatic adenocarcinoma.
Congresso Nazionale SIAPEC-IAP, Bari, 25-27 settembre 2008. Patologica Vol. 100 – N.4.

Salvi S.-Ferro P.-Boccardo S.-Truini M.-Franceschini M.-Gorji N.-Dessanti P.-Bacigalupo B, Pistillo M.P.-Fedeli F.-Roncella S.
HER-2/neu status in human pancreatic adenocarcinoma: comparative study of expression, amplification and aneuploidy.
50° Congresso Nazionale della Società Italiana di Cancerologia (SIC). Napoli, 6-9 ottobre 2008

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Valutazione della farmacocinetica di letrozolo e dei livelli di estrone solfato in pazienti affette da carcinoma mammario estrogeno positivo

Linea di ricerca: 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

Programma: c - Identificazione di indicatori di risposta ai trattamenti

Responsabile: M. Ornella Vannozzi

Durata: 2006-2008

Parole chiave: letrozolo; estrone solfato; carcinoma mammario; farmacocinetica

Altre strutture IST: S.C. Oncologia Medica A (C. Bighin, L. Del Mastro)

Altri Enti coinvolti: Istituto Toscano Tumori, Firenze (R. Notaro)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica sperimentale

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Background

Nelle donne in stato postmenopausale gli estrogeni sono sintetizzati nei tessuti periferici. L'ultimo passaggio della sintesi di estrogeni è la conversione degli androgeni androstenedione e testosterone rispettivamente negli estrogeni estrone ed estradiolo. Questa reazione di trasformazione è catalizzata dall'enzima aromatasi (codificato dal gene CYP19). Il letrozolo è un farmaco attivo oralmente in grado di legarsi all'aromatasi ed agire come potente inibitore dell'enzima. Dal punto di vista farmacocinetico il letrozolo ha una biodisponibilità del 99.9%, ed una lunga emivita (2 giorni nei volontari sani). In studi clinici il raggiungimento dello stato-stazionario della concentrazione plasmatica è stata osservata tra le 2 e le 6 settimane di trattamento. Il farmaco viene metabolizzato a livello epatico dagli isoenzimi del citocromo P450 3A4 e 2D6 nel suo maggior metabolita, il CGP44645 privo di attività farmacologica. L'affinità per l'enzima CYP3A4 sembra essere bassa ed ai livelli fisiologici del farmaco non si raggiunge saturazione dello stesso. Al contrario, l'affinità per l'enzima CYP2D6 è alta e la farmacocinetica del letrozolo potrebbe essere influenzata da fenomeni di auto-inibizione/saturazione così come da differenze soggettive in questa via metabolica o dall'interazione con altri farmaci. La farmacodinamica degli inibitori dell'aromatasi è generalmente valutata per mezzo del dosaggio ormonale degli estrogeni. Tuttavia l'utilizzo dei livelli circolanti di estrogeni (estrone e estradiolo) per la valutazione dell'efficacia della inibizione dell'aromatasi è un metodo abbastanza grossolano a causa delle notevoli difficoltà tecniche nel misurare livelli estremamente bassi di estrogeni in donne in stato postmenopausale. Il problema è minore per l'estrone solfato che è prodotto tramite solfatazione dell'estrone, i cui livelli sono in equilibrio con quelli dell'estrone e dell'estradiolo e che è circolante in quantità sufficiente da essere più facilmente valutabile grazie anche allo sviluppo di metodi di dosaggio altamente sensibili. E' stato dimostrato che il trattamento con inibitori dell'aromatasi causa una caduta simile delle concentrazioni di tutti e tre gli estrogeni.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Scopo del progetto è il monitoraggio delle concentrazioni del letrozolo nel tempo e la valutazione della correlazione tra la farmacocinetica del letrozolo e l'inibizione dell'aromatasi calcolata tramite il decremento percentuale delle concentrazioni di estrone solfato in un trattamento di lungo periodo (tre anni).

I dati ottenuti saranno anche correlati all'analisi dei polimorfismi genetici del gene CYP19 eseguita sulle stesse pazienti (Oncologia Medica C) ed alla risposta clinica ottenuta nelle pazienti (Oncologia Medica A - L. Del Mastro).

Beneficiari

Lo studio è orientato a migliorare la terapia ormonale nelle donne con carcinoma mammario estrogeno positivo in post-menopausa

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

ESTRONE SOLFATO: l'analisi dell'estrone solfato (ES) è stata eseguita tramite metodica RIA su un totale di 174 pazienti. Circa 1/3 della popolazione (32%) presentava concentrazioni di ES basale tra 100 e 200 pg/mL mentre il 29% della popolazione sotto i 100 pg/mL ed il rimanente 39% sopra i 200 pg/mL.

Mettendo in correlazione tali dati con 4 polimorfismi del gene Cyp19 (rs10046, rs4646, rs749292 e rs727479), sono state evidenziate differenze di concentrazione di ES basale a seconda del polimorfismo ottenuto.

Inibizione di ES da parte del letrozolo: sono state analizzate le concentrazioni di ES in 140 campioni di plasma ottenuti da pazienti 6 settimane dopo l'inizio del trattamento con il letrozolo. Confrontando le concentrazioni basali con quelle valutate dopo 6 settimane di trattamento si è riscontrata un'inibizione mediana dell'82%. Come aspettato, l'inibizione della produzione ormonale da parte del letrozolo ha determinato quindi uno spostamento verso valori bassi delle concentrazioni di ES con un 84% delle pazienti con valori inferiori a 100 pg/mL, un 11% con valori compresi tra 100 e 200 pg/mL e solamente un 5% con valori maggiori di 200 pg/mL.

Farmacocinetica del letrozolo: La farmacocinetica del letrozolo è stata valutata in 52 pazienti dopo sei settimane di trattamento. Le pazienti sono state suddivise in base alla loro risposta al letrozolo come segue:

- Gruppo 1: 26 pazienti che dopo sei settimane di terapia con letrozolo NON avevano ottenuto una inibizione della produzione degli estrogeni superiore al 50%

Consuntivo progetti RC 2006-2008

- Gruppo 2: 26 pazienti che dopo sei settimane di terapia con letrozolo avevano ottenuto una inibizione della produzione degli estrogeni superiore al 75%.

L'analisi farmacocinetica del letrozolo è stata eseguita per valutare eventuali differenze di concentrazione plasmatica del farmaco nei due gruppi. Le concentrazioni medie (+/-DS) ottenute sono state rispettivamente: 384 (+/-187) nM/L nel gruppo 1 e 402 (+/-225) nM/L nel gruppo 2. Le differenze non sono risultate essere statisticamente significative.

In conclusione, i dati fin qui ottenuti si possono così riassumere:

- nelle donne in menopausa, la produzione di estrogeni è legata ai polimorfismi del gene Cyp19;
- l'inibizione di ES riscontrata dopo 6 mesi di terapia con letrozolo annulla tali differenze genetiche;
- la risposta alla terapia con letrozolo (valutata come inibizione di ES) non è correlata alla sua farmacocinetica.

Considerata l'ampia variabilità interindividuale delle concentrazioni di estrogeni circolanti nelle pazienti in terapia con letrozolo, risulta quindi importante aumentare la casistica e prolungare il monitoraggio delle concentrazioni dell'ES al fine di correlarle successivamente con il follow-up clinico.

Presentazione a convegni:

Venturini M.-Serra M.-Piccioli P.-Levaggi A.-Boni L.-Vannozzi M.-Aitini E.-Boni C.-Bottini A.-Cianciulli A.-Cognetti F.-DePlacido S.-DiBlasio B.-Driol P.-Fava S.-Merlano MC.-Ponzone R.-Porpiglia M.-Sconamiglio G.-DelMastro L.-Notaro R and Lunardi G.

Single nucleotide polymofisms (SNPS) of CYP19A1 are associated with plasma levels of estrone sulfate (ES) in postmenopausal women with breast cancer (BC)

Ann Oncol. Vol 19: Suppl 9, M10;2008