

S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica

Identificazione di nuovi fattori prognostici e predittivi ai fini della caratterizzazione biologica e della progressione di malattia nei melanomi della coroide e cutanei

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

Programma: a - Definizione del profilo di rischi individuale in pazienti con neoplasie in fase iniziale o avanzata

Responsabile scientifico: Sandra Salvi

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Mauro Truini, Simona Boccardo, Marina Gualco, Barbara Garzoglio

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: melanoma dell'uvea; melanoma cutaneo; p16; immunoistochimica; FISH

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Oncologia Medica A (P. Queirolo); S.S. Genomica Funzionale (U. Pfeffer); S.C. Genetica dei Tumori (M.P. Pistillo)

Altri Enti coinvolti: S.S. Oculistica oncologica, Ospedali Galliera, Genova (C. Mosci); S.C Anatomia e Citoistologia Patologica, ASL3 Ge Ponente (L. Anselmi); Dept. of Pathology, The Royal Liverpool and Broadgreen University Hospital, UK (S. Coupland)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica osservazionale

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Background

La ricerca si articola in due aspetti principali:

a) Il melanoma dell'uvea è il tumore oculare primitivo più comune. E' una patologia comunque poco frequente. L'età media di diagnosi è circa 55 anni. Dopo i 70 anni si riduce notevolmente la frequenza del tumore, contrariamente a quanto avviene per la maggior parte dei tumori maligni dell'adulto la cui incidenza aumenta con l'età.

L'ereditarietà non sembra avere un ruolo importante, tuttavia una familiarità è stata osservata in alcuni casi. Per il melanoma cutaneo invece è stata riconosciuta un'ereditarietà nel 10% dei casi.

La diagnosi di melanoma uveale viene effettuata in sede clinica. In prima istanza il trattamento è conservativo mediante radioterapia con protoni o ioni di elio o mediante l'applicazione di placche episclerali radioattive; il trattamento chirurgico radicale con enucleazione del bulbo è utilizzato solamente nei casi di tumori molto grandi o quando la terapia conservativa non ha alcun effetto.

La prima sede di localizzazione metastatica, che avviene per via ematica, è al fegato in quasi la totalità dei casi e, dopo la diagnosi clinica di metastasi epatiche, l'aspettativa di vita è estremamente modesta (5, 7 mesi).

Diversi autori hanno notato che le caratteristiche morfologiche del tumore non rappresentavano le uniche variabili prognostiche, infatti anche in presenza di fattori sfavorevoli alcuni pazienti sopravvivevano per anni senza sviluppare metastasi, mentre altri con tumori di basso grado sviluppavano metastasi.

Lo studio della biologia molecolare ha permesso di identificare il ruolo nello sviluppo delle patologie umane delle alterazioni genetiche; in particolare la FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) mediante l'uso di sonde specifiche ha consentito di studiare anche le minime anomalie cromosomiche e il loro ruolo nella trasformazione cellulare. Infatti nella pratica clinica la determinazione di alterazioni cromosomiche può avere importanza sia ai fini prognostici che del trattamento terapeutico. In particolare nel caso del melanoma dell'uvea sono stati identificati la monosomia del cromosoma 3 (Bcl6), riarrangiamenti strutturali che coinvolgono il cromosoma 8 (in genere isocromosoma per il braccio lungo) e la delezione del cromosoma 6. Mentre le alterazioni di quest'ultimo si ritrova anche nei melanomi cutanei, la monosomia del cromosoma 3 e la polisomia del cromosoma 8 sembrano essere specifici per il melanoma dell'uvea: in particolare la perdita di un cromosoma 3 è stata riscontrata solo in questa neoplasia.

Recenti studi in pazienti con melanoma della coroide hanno evidenziato come in particolare la presenza di entrambe le anomalie del cromosoma 3 e 8 sia associata con prognosi sfavorevole, mentre le anomalie del cromosoma 6 indicavano una prognosi favorevole.

b) Negli ultimi decenni, l'incidenza del melanoma cutaneo e la mortalità ad esso correlata sono risultate in continuo aumento in tutto il mondo. Il melanoma colpisce una popolazione di pazienti più giovane rispetto ad altri tumori maligni ed insieme ai linfomi rappresenta una patologia difficile da diagnosticare.

I fattori di rischio per lo sviluppo del melanoma cutaneo sono legati sia a fattori ambientali, come l'eccessiva esposizione ai raggi uv, sia legati a caratteristiche specifiche del singolo individuo o di familiarità. Circa il 10% dei pazienti con melanoma hanno almeno un altro membro della propria famiglia affetto da melanoma. La presenza di questa ereditarietà ha suggerito una base genetica con un meccanismo autosomico dominante.

In circa il 60-70% dei pazienti con melanoma sporadico è presente delezione del gene CDKN2A, mentre una mutazione si osserva solo nel 10 - 15%. Si ritiene che tale delezione possa giocare un ruolo importante nella genesi del melanoma mediante l'alterazione del ciclo cellulare. La proteina p16 è il prodotto del gene CDKN2A localizzato nella regione 9p21. La p16 normalmente regola il ciclo cellulare attraverso la disattivazione del complesso CDK4/6 (Cyclin-Dependent Kinase 4/6) legato alla ciclina D. La p16 mutata o assente non può opporsi al complesso CDK4/6- Cyclin D nella transizione dalla fase G1 alla fase S. I cicli cellulari accelerano e l'indice mitotico aumenta. Si pensa che questo

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

sia uno dei principali eventi nello sviluppo del melanoma. Alcuni lavori di immunocitochimica sull'espressione della p16 hanno dimostrato una perdita di p16 nei melanoma con profonda invasione e nelle metastasi, sebbene non si sia dimostrata una correlazione lineare tra spessore del melanoma e perdita di p16. L'ulcerazione, l'invasione vascolare, l'indice mitotico, lo stadio, un ridotto intervallo libero di malattia, la presenza di metastasi linfonodali e la sopravvivenza a 5 anni sono significativamente correlate nel melanoma alla perdita o alterazione del gene soppressore p16.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

a) Scopo del presente studio è di:

- identificare indicatori prognostici di sviluppo metastatico della malattia, che possano individuare gruppi di rischio su cui poter concentrare l'utilizzo di terapie adiuvanti, confrontando le alterazioni geniche riscontrate (monosomia del cromosoma 3 e polisomia del cromosoma 8) con i markers prognostici standard e di correlarli con gli altri fattori prognostici di sopravvivenza, con il rischio di sviluppo di malattia metastatica e di mortalità e con i parametri clinici ed istologici

- valutare se lo studio del materiale citologico con metodica FISH ottenuto mediante aspirazione con ago sottile (FNABS) è un metodo valido per la determinazione dei parametri genetici prognostici, valutando statisticamente se c'è una buona concordanza tra i risultati ottenuti dai campioni citologici e quelli istologici. E' infatti importante stabilire se tali dati possono essere ottenuti anche dall'esiguo quantitativo di cellule presenti nel solo aspirato, con la possibilità di utilizzare tale metodica per poter fornire un giudizio prognostico ad indirizzo terapeutico ("Metodo Liverpool", Centro di Oncologia Oculare di Liverpool).

- confrontare alcune specifiche differenze con gli studi di espressione genica e proteomica.

b) Ulteriore obiettivo è quello di contribuire con tecniche di immunocitochimica (perdita della proteina p16) e l'uso di biologia molecolare FISH all'identificazione di alterazione di geni coinvolti nella trasformazione melanocitaria e nella progressione tumorale del melanoma cutaneo. Si prevede quindi di selezionare pazienti affetti da melanoma cutaneo sporadico o familiare su cui procedere con analisi immunocitochimica alla perdita o variazione della proteina p16 ed alla caratterizzazione citogenetico-molecolare mediante tecniche di ibridazione in situ delle anomalie cromosomiche clonali dei geni coinvolti.

L'immunocolorazione della proteina p16 sarà valutata con tre differenti parametri: una combinazione di colorazione nucleare e citoplasmatica, solo colorazione citoplasmatica o assenza di colorazione. Saranno osservate le diminuzioni di intensità di colorazione tra nevo e melanoma con metastasi e senza metastasi per valutare una sua correlazione con la presenza di localizzazioni secondarie e sopravvivenza.

Verrà verificata inoltre la possibile correlazione tra le anomalie del gene CDKN2A, lo stato di progressione della malattia e i parametri morfologici, clinici e tradizionali utilizzati a livello prognostico e terapeutico.

L'obiettivo finale è identificare per entrambi espressioni geniche in grado di spiegare l'esclusiva presenza di metastasi a livello epatico nel melanoma della corioide e la massiva diffusione metastatica linfonodale in alcuni casi di melanoma cutaneo non correlate con i parametri istologici quali il livello di infiltrazione (Breslow).

Impatto assistenziale certo o potenziale

a) I risultati di questo studio, mediante l'analisi delle alterazioni citogenetiche (monosomia del cromosoma 3, polisomia del cromosoma 8 e aberrazioni del cromosoma 6), possono, come già dimostrato in alcuni lavori, essere correlati all'andamento ed allo sviluppo della malattia in pazienti con melanoma dell'uvea e identificare gruppi di rischio su cui concentrare l'uso di terapie adiuvanti.

La messa a punto e conseguente utilizzazione della metodica FISH su aspirati con ago sottile (FNABS) oltre che su tessuti inclusi in paraffina, potrebbero dimostrare una significativa correlazione tra l'alterazione dei cromosomi di pazienti affetti da melanoma uveale e la loro prognosi, aprendo così nuove ed importanti prospettive sull'uso di questa procedura diagnostica, identificando con assoluta certezza pazienti che potranno essere trattati con terapia locale senza asportazione del bulbo oculare e pazienti che dovranno essere sottoposti a chirurgia radicale poiché ad alto rischio di malattia metastatica.

b) Le indagini di questo studio rivolte ad analizzare l'immunoreattività della proteina p16 e ad evidenziare la delezione della regione 9p21 con metodica FISH saranno effettuate su sezioni istologiche di nevi e melanomi, per confermare i dati riportati in letteratura in relazione all'applicazione del biomarcatore nella diagnosi differenziale tra nevo e melanoma, nella progressione e nella storia naturale del tumore.

Infatti tali dati potrebbero confermare, come già riportato in letteratura, l'importanza dell'espressione della proteina p16 come marker prognostico nei pazienti affetti da melanoma. La valutazione immunocitochimica dello stato di espressione della p16 potrebbe essere un indice prognostico per il trattamento nella terapia del melanoma ed un fattore predittivo per lo stato metastatico dei linfonodi. Tali indagini potrebbero portare ad una diversa condotta terapeutica relativa alla necessità di eseguire una linfadenectomia regionale basata su parametri molecolari nei pazienti con espressione della p16 e delezione della regione 9p21.

Risultati e prodotti 2009

a) Durante il 2009 è stata messa a punto la metodica per l'identificazione tramite tecnica FISH delle anomalie cromosomiche (monosomia del cromosoma 3 e polisomia del cromosoma 8) che sembrano essere correlate all'andamento ed allo sviluppo della malattia in pazienti con melanoma dell'uvea. Sono stati analizzati 55 casi inclusi in paraffina di cui 23 retrospettivi forniti dalla ASL3.

E' anche stata messa a punto la metodica FISH su aspirati con ago sottile (FNABS) utilizzando il "metodo Liverpool" (Centro di Oncologia Oculare di Liverpool). Sono state valutate le alterazioni citogenetiche (monosomia del cromosoma 3 e polisomia del cromosoma 8) su 15 preparati ottenuti dopo aver portato le cellule ago aspirate in interfase. I risultati così ottenuti sono stati paragonati alle alterazioni valutate dai preparati in paraffina dopo enucleazione degli stessi pazienti, per la validazione di tale metodica ai fini prognostici e terapeutici. In tutti i casi è stata evidenziata una totale corrispondenza tra le alterazioni ottenute da entrambe le metodiche.

b) Per la valutazione dell'espressione immunocitochimica della proteina p16 è stato utilizzato CINtec Histology Kit, approvato CE, che permette l'identificazione qualitativa della p16 a livello di nucleo, citoplasma e nucleo/citoplasma su

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

sezioni di tessuto fissate in formalina e inclusi in paraffina. Sono stati selezionati 57 casi di pazienti con diagnosi certa di melanoma, nevo, nevi di difficile diagnosi istopatologica, nevo displastico, nevo di spitz/reed, melanomi sottili (spessore non superiore a 2 millimetri), casi con linfonodo sentinella positivo e negativo. Su tutti questi casi era stata eseguita l'indagine molecolare con il Melanoma probe FISH set (Abbott), che evidenzia le alterazioni citogenetiche sul cromosoma 6 e 11 caratteristiche del melanoma cutaneo, di aiuto nella diagnosi di lesioni "ambigue". E' stata inoltre validata la metodica FISH con l'utilizzo della sonda specifica per il gene CDKN2A sulle sezioni di casi inclusi in paraffina.

Presentazioni a congressi

Boccardo S.-Salvi S.-Gualco M.-Calabrese A.-Mosci C.-Truini M.

Ibridizzazione in situ applicata a casi di melanoma.

XXXIV Incontro di Istopatologia Dermatologica, Torino - Centro Congressi Unione Industriale, 26-27 marzo 2009.

S. Salvi.

Il melanoma oculare clinica e biologia. Aberrazioni cromosomiche nel melanoma dell'uvea : caratteristiche ed applicazioni della tecnica FISH in oncologia oftalmologica

15° Congresso Annuale Intergruppo melanoma Italiano, Genova - NH Marina Hotel, 18-20 ottobre 2009

S. Salvi.

Indagini Molecolari (Melanoma FISH Probe set) nella diagnostica differenziale delle lesioni melanocitarie Casistica IST e ASL 3.

II Audit Clinico in Dermopatologia - Aule S.C. Aggiornamento e Formazione, Via G. Maggio 6 Genova Quarto, 21 novembre 2009

Salvi S.-Boccardo S.-Gualco M.-Arbicò.-R, Mosci C.-Anselmi L.-Truini M.

Aberrazioni cromosomiche nel melanoma maligno dell'occhio.

XXXIV Incontro di Istopatologia Dermatologica, Torino - Centro Congressi Unione Industriale, 26-27 marzo 2009..

M. Truini.

La FISH nella diagnosi del melanoma oculare.

Milano Melanoma 2009 - Centro Polidisciplinare Melanoma, Casa di Cura S: Pio X, Milano 20-21 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

a) Durante il 2010 si prevede di applicare la metodica FISH alle aberrazioni del cromosoma 6 correlate con prognosi favorevole ed applicabile dove presente una sola delle precedenti alterazioni (cromosoma 3 e cromosoma 8). Sembra infatti che ci sia un ordine cronologico nella comparsa delle anomalie. Si intende inoltre ampliare la casistica, sia retrospettiva che prospettica, con un numero di 100 casi. Ampliando la casistica si intende inoltre validare la metodica su ago aspirato.

In un secondo tempo i risultati così ottenuti saranno correlati con le caratteristiche di ogni paziente e con il follow-up. I risultati ottenuti saranno inoltre confrontati con alcune specifiche differenze rilevate con studi di espressione genica e proteomica. Si cercherà di dimostrare quale potrà essere il trattamento più appropriato per un paziente con melanoma della corioide riducendo i casi sottoposti a trattamento chirurgico radicale.

b) Durante il 2010 si intende applicare la tecnica FISH, per l'evidenziazione delle delezioni della regione 9p21, ai casi su cui è stata valutata l'espressione immunohistochimica della proteina p16. Si intende inoltre ampliare la casistica sia con tecnica immunohistochimica che di biologia molecolare e correlare i dati così ottenuti ai parametri clinici, morfologici, tradizionali e citogenetici propri delle lesioni cutanee per un loro eventuale utilizzo a livello prognostico e terapeutico. Saranno esaminati almeno 100 casi con le caratteristiche di selezione dei 57 casi già eseguiti e classificati secondo la localizzazione (nucleo e/o citoplasma) della proteina p16 e delezione della regione 9p21. Le diminuzioni di intensità di colorazione tra nevo e melanoma con metastasi e senza metastasi saranno correlate con la presenza di localizzazioni secondarie e sopravvivenza. Tali dati potrebbero confermarsi di valore prognostico nella terapia del melanoma e predittivo per lo stato metastatico dei linfonodi. Dopo un abbinamento dei risultati così ottenuti con le diagnosi istologiche si procederà ad una revisione dei preparati istologici discordanti.

Importanza della valutazione dell'assetto cromosomico nella definizione della prognosi, diagnosi e scelta terapeutica nelle neoplasie: gliomi e linfomi non-Hodgkin
--

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

Programma: a - Definizione del profilo di rischio individuale in pazienti con neoplasia in fase iniziale o avanzata

Responsabile scientifico: Annalisa Zunino

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Laura Ottaggio, Silvia Viaggi

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: linfomi non Hodgkin; gliomi; citogenetica; FISH; cellule staminali

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Altre strutture IST partecipanti: S.S. Malattie Linfoproliferative (S. Zupo); S.S. Mutagenesi Molecolare e Riparazione del DNA (G. Frosina); S.C. Trasferimento Genico (A. Daga); S.C. Genetica dei Tumori (M. Romani); S.C. Oncologia Medica C (M. Colombo)

Altri Enti coinvolti: S.C. Ematologia, A.O.U. San Martino, Genova (M. Spriano - Gruppo Tumori Cerebrali, R. Spaziante - Gruppo Ligure Linfomi, A. Carella)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica osservazionale

Area di interesse: diagnostica

Background

I linfomi non-Hodgkin a cellule B (LNH) includono patologie di aspetto molto eterogeneo. La loro classificazione ha subito molte modifiche. La citogenetica ha contribuito alla definizione di queste patologie e costituisce uno dei parametri presi in considerazione nella definizione della diagnosi. Permangono tuttavia dei tipi di linfomi che risultano di più difficile classificazione sia per la loro rarità che per scarsità di parametri biologici alterati. Questo è il caso dei tumori marginali (MZL), che costituiscono circa il 10% dei LNH. Gli MZL sono tumori ad andamento generalmente indolente, tuttavia talvolta pongono problemi di diagnosi differenziale da patologie più aggressive (es. linfoma mantellare) ed alcuni casi possono evolvere a patologie ad alto grado. Il cariotipo si presenta spesso normale, tuttavia alcune anomalie più frequenti sono riportate in letteratura (trisomia 3, delezione 7q, t(11;18), trisomia 18) e differiscono a seconda dei sottotipi presi in considerazione. Anche la frequenza con cui queste anomalie vengono riscontrate differisce nei diversi studi.

Il mieloma multiplo (MM) è una neoplasia monoclonale a cellule B, che originano teoricamente dal centro germinativo del linfonodo, ma che si localizzano ed espandono nel midollo osseo. Gli MM rappresentano circa il 10% dei tumori ematologici e in un terzo dei casi questa patologia può essere preceduta da una fase di gammopatia monoclonale di significato incerto (MGUS). La sopravvivenza va da pochi mesi a più di venti anni, con una mediana, nonostante la chemioterapia, di non più di 24-36 mesi. L'introduzione di chemioterapia ad alto dosaggio supportata da trapianto autologo, ha innalzato la mediana di sopravvivenza sino a più di 5 anni. Tuttavia, una grande variabilità nella sopravvivenza di questi pazienti permane. Di conseguenza lo studio dei fattori prognostici che possano non solo predire la sopravvivenza, ma anche indirizzare la terapia si è molto sviluppato negli ultimi anni. Le aberrazioni più frequenti sono il guadagno del cromosoma 11q e la delezione della regione 13q14. Le traslocazioni coinvolgono principalmente la regione 14q32 e avvengono con partner differenti (cromosoma 4, cromosoma 11, cromosoma 16); la delezione di p53, sebbene non frequente, è importante per la cattiva prognosi che ne consegue. L'impiego della tecnica FISH interfascia permette di individuare anomalie cromosomiche in un numero maggiore di pazienti, in particolare se associata a un metodo per marcare o separare le plasmacellule, per meglio identificare le cellule neoplastiche.

I gliomi costituiscono più del 70% dei tumori cerebrali. Il glioblastoma è il più comune e il più maligno tra i gliomi (65%). Meno del 3% dei pazienti affetti da glioblastoma è ancora vivo a 5 anni dalla diagnosi. La classificazione dei gliomi comprende 4 classi (I, II, III, IV) con grado crescente di malignità e invasività. Nell'ultimo decennio sono stati fatti molti progressi per quanto concerne la genetica di queste neoplasie; si è visto che la codelezione delle regioni 1p36 e 19q13 sono indice di un migliore andamento della malattia e di risposta alla terapia. Mentre altre anomalie, osservate prevalentemente nei glioblastomi (del(10q23), del(9p21) e amp(7p12)), sono indice di cattiva prognosi. I glioblastomi possono essere primari o possono essere l'evoluzione di tumori a basso grado (secondari). Esiste uno studio in cui sembra che i due tipi di tumore possano essere distinti in base alle loro caratteristiche citogenetiche. La conferma di questo dato potrebbe rivestire una importanza non solo per migliorare le conoscenze sull'evoluzione di questa patologia, ma anche da un punto di vista clinico; infatti, glioblastomi primari e secondari hanno una prognosi diversa. Infine, esistono evidenze che gran parte della resistenza dei gliomi maligni al trattamento radio-chemioterapico sia da attribuire alle cellule staminali tumorali che presentano alterazioni nei meccanismi di risposta al danno al DNA o di riparazione dello stesso danno.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo del progetto è quello di individuare la/e anomalia/e che permettono di discriminare con sempre maggiore accuratezza le patologie a diversa prognosi ed indirizzare la terapia.

Altro obiettivo è quello di individuare le diverse anomalie cromosomiche e confrontarle con dati ottenuti studiando diversi parametri, nonché con i dati clinici dei pazienti.

Lo studio delle cellule staminali tumorali dei glioblastomi ci permetterà inoltre di individuare anche eventuali nuove anomalie cromosomiche.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Uso del pannello di anomalie nella classificazione della malattia e nella scelta terapeutica.

Risultati e prodotti 2009

Sono stati presi in considerazione 17 casi di gliomi di cui 6 oligodendrogliomi di II grado (OG), 5 oligodendrogliomi anaplastici di III grado (OA) e 6 glioblastomi multiformi di IV grado (GBM). L'associazione delle delezioni 1p e 19q è stata riscontrata esclusivamente negli OG (50%). L'amplificazione della regione 7p12 (EGFR), assente negli OG, è stata riscontrata nel 60% degli OA e nel 33% dei GBM. La delezione della regione 9p21 (p16) e della regione 10q23 (pTEN) sono risultate presenti in tutte e tre le forme con una frequenza paragonabile. Per quanto concerne la correlazione con la sopravvivenza non è possibile effettuare una correlazione tra anomalie cromosomiche e sopravvivenza nei pazienti affetti da OG essendo ancora tutti in vita. Per quanto concerne i pazienti affetti da OA, due su quattro erano deceduti ed entrambi presentavano l'amp(7p12). Infine per quanto concerne i pazienti affetti da GBM cinque su sei erano deceduti ed il dato rilevante è che l'unico paziente sopravvissuto è stato l'unico nel quale non è stata riscontrata alcuna anomalia cromosomica.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Per quanto concerne gli studi sulle cellule staminali tumorali di glioblastoma è stato portato a termine il confronto con i dati delle altre unità.

Pubblicazioni

Roncoroni L.-Elli L.-Bardella M.T.-Dogliotti E.-Grimoldi M.G.-Viaggi S.-Erba E.-Zunino A.-Doneda L.
Cytogenetic characterization and cell cycle analysis of three human colon adenocarcinoma cell lines: comparison between two- and three dimensional cell culture systems.
Cancer Invest. Epub Dec 8, 2009.

Ropolo M.-Daga A.-Griffero F.-Foresta M.-Casartelli G.-Zunino A.-Poggi A.-Cappelli E.-Zona G.-Spaziante R.-Corte G.-Frosina G.
Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures.
Mol Cancer Res. 7(3):383/92; 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Per quanto concerne i linfomi non-Hodgkin, si procederà nella raccolta dei casi e nel confronto dei dati ottenuti con i dati ottenuti da altre unità operative. Proseguirà anche il confronto con i dati clinici dei pazienti.

Si aumenterà la casistica dei gliomi, ponendo particolare attenzione ai gradi più elevati. Si effettueranno i confronti con i dati ottenuti da altre strutture operative e con la sopravvivenza dei pazienti.

In collaborazione con altre strutture dell'Istituto, si proseguirà lo studio dell'assetto cromosomico delle cellule staminali tumorali. Saranno presi in considerazione non solo i tumori cerebrali ma anche altre neoplasie (mesotelioma).

Studio della componente neuroendocrina nei tumori ovarici di derivazione dall'epitelio di superficie (epithelial-stromal type) e correlazione della stessa con l'evoluzione clinica e la prognosi delle neoplasie

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

Programma: a - Definizione del profilo di rischio individuale in pazienti con neoplasie in fase iniziale o avanzata

Responsabile scientifico: Marina Gualco

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Mauro Truini, Marco Mora, Sandra Salvi

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: tumori epiteliali dell'ovaio; tumori misti neuroendocrini-epiteliali; marcatori neuroendocrini

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Oncologia Medica C (M. Bruzzone)

Altri Enti coinvolti: U.O. Anatomia Patologica Universitaria, A.O.U. San Martino, Genova (E. Fulcheri)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica osservazionale

Area di interesse: diagnostica

Background

Le neoplasie originanti dal Sistema Neuroendocrino possono essere suddivise in due grandi gruppi: 1) neoplasie di tipo neurale (neuroblastoma, feocromocitoma e paraganglioma), 2) neoplasie di tipo epiteliale (carcinoidi e tumori neuroendocrini).

Per quanto riguarda le neoplasie di tipo epiteliale si è avuta negli ultimi anni una revisione della nomenclatura ed una nuova catalogazione è stata proposta e successivamente inserita nella più recente classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) (Solcia E et al, 2000), che suddivide i tumori neuroendocrini in: 1) tumori endocrini ben differenziati, 2) carcinomi endocrini ben differenziati, 3) carcinomi endocrini poco differenziati (small o large cell carcinoma), 4) tumori misti esocrini-endocrini. Tale classificazione è stata elaborata tenendo conto di una serie di criteri quali la sede, il volume, la documentata presenza di metastasi, la presenza di angioinvasione, o ancora il tipo di secrezione ormonale e la presenza o meno di una sindrome clinica associata.

Le neoplasie caratterizzate dalla combinazione di una componente di tipo neuroendocrino ed una componente esocrina epiteliale di tipo non neuroendocrino – per esempio ghiandolare, squamosa o uroteliale – sono ben conosciute in letteratura e possono insorgere in vari organi, con variabile entità della commistione tra tali due componenti: ad un estremo dello spettro sono rappresentate le neoplasie neuroendocrine pure, costituite interamente da elementi neuroendocrini, mentre all'estremo opposto sono rappresentate le neoplasie esocrine pure, costituite interamente da elementi epiteliali e prive di una anche minima componente cellulare esocrina. Esistono poi entità nosografiche descritte in letteratura comprese tra le neoplasie "pure" sopradescritte; in esse la presenza di una differenziazione neuroendocrina si esprime in percentuali variabili rispetto alla massa neoplastica totale (teoricamente da 1 a 99%) e con pattern morfologici diversi ma principalmente riferibili alla presenza di singole cellule sparse disordinatamente nel contesto della neoplasia epiteliale ovvero alla formazione di aree organizzate in trabecole, cordoni o nidi e plaghe solide, a configurare aspetti di tipo "organoide" talora ben riconoscibili e distinguibili dalla neoplasia epiteliale circostante.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Accade invece meno frequentemente di rilevare la presenza di focali aree di differenziazione epiteliale all'interno di neoplasie neuroendocrine come, per esempio, nel carcinoma a piccole cellule del polmone che esprime in alcuni casi foci di adenocarcinoma o di carcinoma squamoso.

Per ciò che concerne i tumori primitivi dell'ovaio, la classificazione WHO non prevede, come accade invece per altri organi, la distinzione tra una forma "pura" di tumore neuroendocrino e una forma "mista", bensì considera, per esempio, caratteristica peculiare del carcinoma neuroendocrino a grandi cellule l'aver associata una componente escrina costituita da una neoplasia ovarica di superficie (epithelial-stromal type), nei vari istotipi e nei vari gradi di malignità con cui essa possa presentarsi.

E' però da notare che sono presenti in letteratura diversi casi segnalati di neoplasie ovariche di derivazione dall'epitelio di superficie (epithelial-stromal type) e di Tumori Mulleriani Misti Maligni (TMMM) primitivi ovarici con presenza di una componente cellulare di tipo neuroendocrino, organizzata in strutture solide o trabecolari e in cellule singole e disperse nella componente epiteliale.

I lavori presenti in letteratura circa la presenza di cellule neuroendocrine nelle neoplasie ovariche epiteliali di superficie (epithelial-stromal type) risalgono complessivamente ad un periodo che va dal 1980 al 2000 ma buona parte di essi – circa la metà – è anteriore agli anni '90, con ciò sottintendendo una minore standardizzazione delle metodiche immunoistochimiche – quando eseguite – di quanto non si abbia oggi nei moderni laboratori.

I risultati della maggior parte di tali lavori, inoltre, potrebbero essere inficiati dall'utilizzo in prima battuta di metodiche istochimiche (Grimelius) per la dimostrazione della componente neuroendocrina, che presentano aspetti di sensibilità e specificità non paragonabili alle metodiche immunoistochimiche ed hanno inoltre una intrinseca – seppur lieve – variabilità dei risultati legata alla varietà dei reagenti utilizzati da laboratorio a laboratorio, delle procedure, nonché dell'operatore stesso.

Lo studio più recente (Changxin, 2000), condotto invece con un appropriato pannello di marcatori immunoistochimici (Cromogranina A) è effettuato su una casistica di soli tumori mucinosi, escludendo gli istotipi sieroso ed endometriode.

A prescindere quindi dalla complessiva affidabilità dei risultati presentati dai lavori suddetti, che hanno il pregio di porre l'attenzione su un aspetto poco studiato della patologia tumorale ovarica, è chiaro come in letteratura non siano presenti dati sufficientemente ampi e precisi circa la presenza di una componente neuroendocrina nelle neoplasie ovariche di superficie ed in particolare in quelle ad istotipo sieroso ed endometriode.

Di tale componente neuroendocrina minoritaria non è fatta menzione nella classificazione WHO dei tumori ovarici di superficie (epithelial-stromal type), escludendo il dato riportato circa la possibile presenza di cellule di Paneth (eutipiche e morfologicamente ben distinguibili) nell'ambito dei cistoadenomi mucinosi di tipo intestinale.

Parimenti, non vi sono in letteratura studi che esprimano risultati certi e definitivi circa l'impatto che tale componente potrebbe avere in senso prognostico o in relazione all'orientamento terapeutico. La componente a differenziazione neuroendocrina è considerata fattore prognostico sfavorevole per gli adenocarcinomi della prostata (Berruti A et al, 2005; Bollito E et al, 2001); in tali tumori la componente neuroendocrina assume più spesso il pattern a cellule singole sparse ed il numero di esse aumenta in rapporto all'aumentare del grado sec. Gleason, divenendo massimo nelle aree a struttura solido-trabecolare (Gleason 5).

La presenza di una componente neuroendocrina cospicua (occasionalmente anche maggiore del 30%) è osservata frequentemente nelle prostatectomie per carcinoma eseguite dopo cicli di ormonoterapia e più frequentemente ancora in quelle neoplasie ormonoresistenti (Bollito E et al, 2001; Eble JN et al, 2004; Helpap B, Kloppel G, 2002).

Inoltre appare interessante il dato che adenocarcinomi del retto operati dopo chemioterapia o radioterapia neoadiuvanti mostrino componenti neuroendocrine cospicue, forse riflettendo la maggiore resistenza delle cellule neuroendocrine - tipicamente poco proliferanti - alle terapie antiblastiche convenzionali ed oggi utilizzate (Shia J et al, 2002).

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo generale della presente proposta è quello di fornire dati circa la presenza, la frequenza e la morfologia di elementi di tipo neuroendocrino nei carcinomi primitivi ovarici di derivazione dall'epitelio celomatico di superficie (epithelial-stromal type) mediante l'utilizzo di marcatori immunoistochimici di differenziazione neuroendocrina (Cromogranina A, Sinaptofisina e CD56).

Inoltre si valuterà la struttura (solida o in cellule singole) con cui tali elementi si organizzano nell'ambito delle neoplasie suddette.

I dati relativi alla presenza – anche quantificata - della componente neuroendocrina saranno poi correlati con i dati relativi al comportamento biologico delle neoplasie in studio, quali lo stadio al momento della diagnosi, il grado di differenziazione e tutti i dati circa l'evoluzione della neoplasia (follow-up) forniti dai colleghi oncologi.

Obiettivo secondario è quello di valutare la specificità e la sensibilità dei marcatori immunoistochimici utilizzati nel rilevare gli elementi cellulari di tipo neuroendocrino e di identificare quelli più idonei per la evidenziazione di tale componente, se esigua.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Impatto assistenziale potenziale del progetto, può essere quello di una ricaduta in termini di diversificazione della strategia terapeutica e di follow-up nelle neoplasie contenenti una componente di tipo neuroendocrino, qualora tale componente dovesse risultare fattore prognostico, analogamente a quanto si cerca di ottenere nell'ambito, per esempio, delle neoplasie neuroendocrine intestinali e polmonari.

Risultati e prodotti 2009

Nel corso del 2009 è continuata la raccolta di tumori ovarici di derivazione epitelio-stromale di superficie con significativa componente neuroendocrina. Come da protocollo presentato, ogni neoplasia oltre alle convenzionali indagini immunoistochimiche volte a caratterizzare il profilo fenotipico, il pattern proliferativo, ormonale e l'espressione di oncogeni o oncosoppressori mutati, è stata studiata per ricercare una eventuale componente neuroendocrina (anticorpi anti Cromogranina A, Sinaptofisina e CD56).

L'indagine è stata focalizzata ai tumori con prevalente componente solida e conseguentemente, a medio-basso grado di differenziazione.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

La casistica raccolta negli anni 2001 – 2008 comprendeva 50 neoplasie, 29 delle quali con presenza di componente neuroendocrina (4 casi con componente neuroendocrina > 30% della massa neoplastica totale, 25 con componente neuroendocrina < 30% della massa neoplastica totale); nel corso dell'anno 2009 si è provveduto ad includere nella casistica 30 nuovi casi aventi le caratteristiche idonee (10 della Anatomia Patologica IST e 20 della Anatomia Patologica Universitaria dell'A.O.U San Martino – Responsabile Prof. Ezio Fulcheri), dei quali sono in corso le indagini immunoistochimiche mediante i marcatori suddetti.

Presentazioni a congressi

Gualco M.-Mora M.-Bruzzone M.-Truini M.-Fulcheri E.
Primary peritoneal and ovarian carcinosarcomas.
22° European Congress of Pathology, 4-9 september 2009, Firenze
Virchows Archiv, 455, S300, 2009.

Mora M.-Gaggero G.-Pigozzi S.-Fulcheri E..
P53 in ovarian mucinous borderline tumors.
22° European Congress of Pathology, 4-9 september 2009, Firenze
Virchows Archiv, 455, S299, 2009.

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Si ritiene indispensabile prolungare il follow up dei casi di tumore ovarico a componente neuroendocrina per verificare se un comportamento biologico anomalo possa essere correlato con tale rara variante dei tumori ovarici.

Il risultato inatteso di una relativamente alta percentuale di casi con espressione lieve o moderata di una componente neuroendocrina stimola viceversa ad estendere la ricerca anche sulle neoplasie ben differenziate (G1).

Alcuni studi (Vang R, Shih IeM, Kurman RJ. "Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems." Adv Anat Pathol. Sep;16(5):267-82, 2009 fra gli altri) hanno proposto una nuova classificazione istogenetica del cancro ovarico, in particolare delle forme sierose, ipotizzando che esistano due differenti linee di proliferazione neoplastica, una che si esprime prevalentemente con forme benigne o borderline e l'altra che si esprime con neoplasie maligne a rapida crescita e molto più aggressive. A livello biomolecolare emergono significative differenze tra i due gruppi di neoplasie come, per esempio, gli elevati livelli di espressione della proteina p53 mutata.

Infine, molte ricerche evidenziano come l'istotipo mucinoso endocervicale sia relativamente più raro rispetto all'istotipo mucinoso intestinale o misto, questo caratterizzato da comportamento biologico molto più aggressivo. Taluni infine ritengono che il tumore mucinoso di tipo intestinale sia raramente primitivo ma che più frequentemente rappresenti la localizzazione ovarica di una neoplasia a partenza dall'appendice ciecale.

Tutte queste osservazioni portano ad innestare il filone della ricerca sulla componente neuroendocrina dei tumori ovarici su queste tematiche cercando evidenze, specie nei tumori mucinosi, di caratterizzazioni istogenetiche sempre più precise volte ad isolare gruppi di neoplasie a più alto rischio.

Identificazione di fattori predittivi della sopravvivenza e della risposta terapeutica in pazienti con leucemia linfatica cronica

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

Programma: b - Predizione della risposta ai trattamenti, inclusa la possibilità di valutare precocemente la risposta definitiva

Responsabile scientifico: Laura Ottaggio

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Silvia Viaggi, Annalisa Zunino

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: B-CLL; citogenetica molecolare; aberrazioni cromosomiche; p53; ATM; FISH

Altre strutture IST partecipanti: S.S. Mutagenesi Molecolare e Riparazione del DNA (P. Menichini, G. Fronza)

Altri Enti coinvolti: Divisione Ematologia, A.O.U. San Martino, Genova (M. Spriano); Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova (M. Miele)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica osservazionale

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Compagnia di San Paolo

Background

La leucemia linfatica cronica di tipo B (B-CLL) è una malattia a decorso prevalentemente indolente ma caratterizzata da una grande eterogeneità nel decorso clinico. La disponibilità di fattori prognostici indicativi del rischio individuale di

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

progressione, di responsività alle terapie e di sopravvivenza sarebbe quindi di enorme importanza. Le aberrazioni cromosomiche, presenti in oltre il 50% dei casi di B-CLL, sono considerate utili marcatori prognostici. La delezione della regione 13q14, che rappresenta l'aberrazione più frequentemente riscontrata nei pazienti B-CLL (40-60% dei casi), non sembra rivestire un particolare valore prognostico. Studi recenti hanno invece correlato la presenza di aberrazioni specifiche con l'andamento clinico e la risposta terapeutica: la delezione del cromosoma 17p, seppur presente solo nel 10% dei casi, risulta il fattore prognostico peggiore, indicativo di tempo minore di sopravvivenza e di refrattarietà alla terapia. Sul cromosoma 17p mappa il gene oncosoppressore p53 che, nonostante non sia coinvolto nella patogenesi di questa malattia, sembra rivestire un ruolo importante nella progressione e nella risposta alla terapia. Il gene p53 risulta mutato solo nel 5-10% delle B-CLL, ma la frequenza di mutazione aumenta al 30% nei pazienti che non rispondono alla terapia con analoghi dei nucleosidi o con agenti alchilanti. La seconda aberrazione cromosomica più frequentemente riscontrata nelle B-CLL è la delezione in 11q (presente nel 15-30% dei casi) che coinvolge il gene ATM, l'inattivazione del quale porta alla mancata attivazione di p53 in risposta al danno al DNA. Ulteriori meccanismi di inattivazione di p53 diversi dalla mutazione, quali il sequestro citoplasmatico di p53, sono stati in precedenza descritti in altre patologie neoplastiche quali il neuroblastoma. Il pathway di p53 potrebbe quindi essere alterato con una frequenza maggiore rispetto a quella della mutazione/delezione.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Analisi di pazienti affetti da B-CLL con metodologie di citogenetica molecolare per la ricerca di correlazioni tra la presenza di aberrazioni cromosomiche specifiche e/o di eventuali associazioni fra aberrazioni specifiche (quali trisomia 12 e 18) e parametri clinici e biologici a carattere prognostico.

Ci si propone inoltre di:

- studiare la localizzazione cellulare di p53 in modelli sperimentali costituiti da cellule umane (tumore polmonare) sensibili o resistenti a chemioterapici in relazione al trattamento con farmaci antitumorali o agenti fisici. Le stesse cellule tumorali saranno usate per testare nuovi composti con attività antimitotica o proapoptotica
- verificare la presenza di mutazioni p53 in pazienti B-CLL che presentano delezione sul cromosoma 17p al fine di identificare pazienti potenzialmente resistenti alla terapia con farmaci che inducono arresto del ciclo cellulare o apoptosi attraverso riattivazione di p53
- proseguire il follow up dei pazienti.

Impatto assistenziale certo o potenziale

L'identificazione e validazione di marcatori predittivi della sopravvivenza e/o della risposta terapeutica permetterà l'individuazione in fase di diagnosi dei pazienti da indirizzare ad un protocollo terapeutico e la scelta del farmaco (tradizionale o di nuova identificazione) o l'utilizzo di terapie alternative (anticorpi monoclonali, trapianto allogenico non mieloablato).

Risultati e prodotti 2009

Uno studio precedente aveva evidenziato un gruppo di pazienti a prognosi sfavorevole con la presenza simultanea di due specifiche aberrazioni cromosomiche (trisomia 12 e trisomia 18), il cui significato prognostico è ancora incerto. Recenti dati di letteratura indicano anche la presenza contemporanea della trisomia 12, 18 e 19, sebbene in una piccola frazione dei casi. Nel corso del primo anno 80 nuovi casi di B-CLL sono stati esaminati con tecniche FISH: 15 di questi mostravano trisomia 12. Al momento sono stati analizzati 30 casi con trisomia 12 con la sonda alfoide per il cromosoma 18, e 21 casi con una sonda locus specifica per il cromosoma 19. La frequenza di trisomia 18 nei pazienti con trisomia 12 risulta essere 17%, mentre quella del cromosoma 19 9.5%. L'associazione fra queste aberrazioni verrà considerata in relazione al decorso della malattia per evidenziare eventuali stratificazioni del rischio e per valutare il valore prognostico di questa associazione di aberrazioni cromosomiche.

Il tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC) costituisce un buon modello sperimentale poiché, parimenti alle B-CLL, le cellule di NSCLC generalmente mostrano resistenza all'apoptosi. Utilizzando queste cellule è stata valutata l'efficacia di alcune molecole note per riattivare funzionalmente p53 nell'indurre apoptosi. Lo stesso modello sperimentale è stato usato per testare nuove molecole con effetto antimitotico. Il tassolo è un farmaco antineoplastico che agisce a livello dei microtubuli coinvolti in molti aspetti della biologia cellulare dal metabolismo cellulare, al trasporto intracellulare, alla mitosi. Il blocco della transizione metafase/anafase è stato considerato un end-point per la valutazione dell'effetto biologico degli estratti vegetali in esame. In particolare è stato preso in considerazione il rapporto anafasi/metafasi e la presenza di mitosi anomale. Sono state approntate curve di taratura utilizzando il farmaco iniettabile Taxol IV, per evidenziare quali fossero le dosi minime alle quali l'end-point può essere valutato. Risultati preliminari indicano che gli estratti di alcune specie vegetali hanno un'attività antimitotica simile al tassolo. Gli estratti ottenuti da queste nuove specie, pur mostrando un'attività antimitotica, sembrano avere un meccanismo d'azione diverso dal tassolo.

Pubblicazioni

Monti P.-Traverso I.-Casolari L.-Menichini P.-Inga A.-Ottaggio L.- Russo D.-Iyer P.-Gold B.-Fronza G.
Mutagenicity of N3/methyladenine: a multi translesion polymerase affair.
Mutat. Res. Fund. Mol. M. Epub Oct 26, 2009

Roncoroni L.-Elli L.-Bardella M.-Dogliotti E.-Grimoldi M.-Viaggi S.-Erba E.-Zunino A.-Doneda L.
Cytogenetic characterization and cell cycle analysis of three human colon adenocarcinoma cell lines: comparison between two and three dimensional cell culture systems.
Cancer invest. Epub Dec 8, 2009

Russo D.-Fronza G.-Ottaggio L.-Monti P.-Inga A.-Iyer P.-Gold B.- Menichini P.
High frequency of genomic deletions induced by Me/lex, a sequence selective N3/adenine methylating agent, at the Hprt locus in Chinese hamster ovary cells.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Mutat. Res. Fund. Mol. M. 671:58/66, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Continuerà l'arruolamento di pazienti di B-CLL da analizzare con metodologie di citogenetica molecolare per la ricerca di correlazioni tra la presenza di aberrazioni cromosomiche specifiche e/o di eventuali associazioni fra aberrazioni specifiche (trisomia 12, 18 e 19) e parametri clinici e biologici a carattere prognostico.

Verrà studiato il comportamento di cellule di NSCLC sensibili o resistenti a chemioterapici a seguito di trattamento con nuovi farmaci in relazione allo status di p53 (mutazione, localizzazione cellulare). Utilizzando queste cellule sarà verificata l'efficacia di alcune molecole note per riattivare funzionalmente p53 nell'indurre apoptosi o morte cellulare apoptosi indipendente. Il farmaco antineoplastico con attività antimitotica più noto è il tassolo, un composto che viene estratto da una gimnosperma a lenta crescita. Proseguiranno gli studi per verificare se altre specie vegetali di più facile coltivazione, sia in vivo che in vitro, possiedono la via metabolica per la produzione dei tassani. Estratti di diverse specie vegetali verranno testati nel modello sperimentale descritto.

Integrazione semantica dei dati in oncologia: obiettivo bioinformatica clinica

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

Programma: b - Predizione della risposta ai trattamenti, inclusa la possibilità di valutare precocemente la risposta definitiva

Responsabile scientifico: Paolo Romano

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: bioinformatica clinica; integrazione dati molecolari e clinici; database; workflow management systems; semantic web

Altre strutture IST partecipanti: S.S. Genomica Funzionale (U. Pfeffer); S.S. Banca Biologica e Cell Factory (B. Parodi, M.A. Manniello); S.S. Biopolimeri e Proteomica (M. Rocco)

Altri Enti coinvolti: Dip. di Informatica, Sistemistica e Telematica, DIST, Università di Genova (M. Giacomini); Istituto G. Gaslini, Genova (L. Varesio); Istituto Scienze delle Macromolecole, CNR, Genova (P. Arrigo); Istituto Scienze delle Alimentazione, CNR, Avellino (A. Facchiano); Softeco Sismat, Genova (G. Viano); University of Malaga, Spain (O. Trelles, J. F. Aldana Montes); Rothamsted Research, Harpenden, UK (A. Splendiani); Technical University of Dresden, Germany (M. Schroeder)

Tipologia progetto: tecnologie abilitanti

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: MIUR; Istituto Superiore di Sanità; Regione Liguria

Background

La disponibilità di una ingente mole di informazioni, la distribuzione dei dati sulla rete Internet e l'eterogeneità dei relativi sistemi informativi rendono la gestione e l'integrazione dei dati biomolecolari compiti molto complessi e onerosi. D'altronde, la ricerca biomedica dipenderà sempre più dall'analisi delle informazioni disponibili on-line sulla rete Internet e la bioinformatica diventerà il più importante strumento di supporto all'analisi per i ricercatori e per i clinici. La prospettiva finale di tale integrazione è la possibilità di correlare strettamente i dati molecolari e clinici nell'ottica di orientare la pratica diagnostica e terapeutica alla medicina personalizzata.

Si deve quindi passare da una gestione dei dati e delle informazioni prevalentemente manuale a una innovativa modalità di gestione e analisi dati a larga, prevalente, componente automatica.

Questo cambiamento è reso possibile dalle tecnologie ICT che, se supportate da una adeguata definizione sintattica e semantica delle informazioni e dall'adozione di standard condivisi, consentono la realizzazione di strumenti di gestione e analisi dei dati altamente "friendly" per l'utente finale (ricercatore, clinico, tecnico) in grado di interagire in maniera efficiente ed efficace con i sistemi informativi che gestiscono la notevole mole di dati biologici disponibili.

Gli elementi chiave per il raggiungimento di questi obiettivi sono: i) lo sviluppo di modelli di dati biologici condivisi e la loro strutturazione formale tramite linguaggi basati su XML, ii) lo sviluppo di database innovativi basati sui linguaggi XML e su altri linguaggi a contenuto semantico esplicito, quali RDF e RDF(S), iii) i Web Services, sia tradizionali, che di tipo semantico, che consentono l'interoperabilità dei sistemi informativi, iv) le ontologie biologiche, nelle loro diverse concezioni (standardizzazione dei dati, annotazione dei database, standardizzazione dei tipi di dati ed elaborazioni), v) i workflow management systems per la creazione di procedure automatizzate di recupero e analisi delle informazioni che consentono di riprodurre l'analisi, riutilizzare i risultati intermedi e aumentare l'efficacia e l'efficienza delle procedure stesse, vi) le tecnologie legate al Semantic Web, che consentono la validazione logica e formale dei dati e l'induzione di nuove informazioni e di conoscenza in maniera automatica (tramite strumenti di reasoning), vii) tecnologie software per il data mining e per il text mining.

La proposta progettuale intende sviluppare un'attività di ricerca già in atto da diversi anni. Il progetto strategico MIUR O2I (Oncology Over Internet), finanziato dal 2002 al 2005, e il progetto FIRB LITBIO (Laboratorio Interdisciplinare di

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Tecnologie Bioinformatiche), finanziato dal 2005 al 2010, sono gli ultimi progetti nel cui ambito si sono acquisite le competenze che si intende ora mettere a frutto, anche grazie al finanziamento concesso recentemente dalla Regione Liguria per una borsa di dottorato su "Liguria eScience (LeS) – Integrazione semantica delle informazioni biomediche a scopo di ricerca di base e traslazionale e per la clinica" (corso di Dottorato di Bioingegneria, proposta di P. Romano, IST, e M. Giacomini, DIST).

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo generale del progetto consiste nello sviluppo di procedure automatizzate per l'integrazione dei dati molecolari e clinici a supporto delle attività di ricerca di base e traslazionale dell'Istituto e degli altri istituti interessati, utilizzando strumenti ICT innovativi, basati sulla semantica delle informazioni.

Questo obiettivo si lega agli obiettivi della linea 3 del piano di programmazione IST 2009-2011 e in particolare alla valutazione del profilo di rischio individuale dei pazienti in relazione alla caratterizzazione bio-molecolare del tumore con l'ausilio di nuove tecnologie, all'individuazione dell'impatto delle caratteristiche individuali dei pazienti e del tumore sulla risposta ai trattamenti e, infine, allo sviluppo di sistemi informativi aggiornati per il SSN.

Per raggiungere questo obiettivo, si intende agire in diverse direzioni:

- sviluppare ulteriormente le competenze del gruppo, alla luce delle rapide innovazioni tecnologiche nel settore ICT, oltre che dei ricercatori interessati,
- analizzare le procedure di analisi dati utilizzate dalle Strutture con le quali si svolge la collaborazione, nell'ottica di definire le migliori modalità di automazione e, nello stesso tempo, studiare diverse modalità di implementazione, che meglio si prestino all'automazione stessa,
- progettare e implementare nuovi sistemi informativi, basati sulle tecnologie ICT citate, di supporto all'automazione delle procedure d'analisi dati, di semplice utilizzo per i ricercatori e in grado di consentire la riproducibilità delle analisi e il riuso dei risultati intermedi,
- progettare e implementare sistemi informativi e strumenti software complementari di interesse e utilizzo più generali.

Questo progetto mira anche a superare l'"impasse" che caratterizza la realtà della ricerca ligure in questo settore, realtà ancora troppo frammentata e non finalizzata. Da un lato (Università), si hanno le competenze necessarie per affrontare in maniera adeguata la problematica evidenziata, ma manca l'esperienza concreta del problema. Dall'altro (IST, Gaslini), ci si confronta quotidianamente con i problemi evidenziati, ma senza avere le competenze necessarie per superarli e, nello stesso tempo, senza quella consapevolezza delle possibili soluzioni che sarebbe necessaria per affrontare un cambiamento sostanziale, se non radicale delle procedure in uso. La competenza interdisciplinare presente in alcuni Istituti (IST, CNR) si scontra quindi con la mancata visione d'insieme degli altri partner e questo rende di fatto molto difficile lo sviluppo e l'adozione di soluzioni efficaci ed ottimali, sia per i risultati che per la qualità del prodotto. Per questo motivo, la collaborazione tra gli Istituti coinvolti diventa a tutti gli effetti strategica.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Gli obiettivi del progetto proposto si prestano a favorire non solo la ricerca, ma anche l'assistenza sanitaria. In effetti, la possibilità di implementare procedure automatiche per l'analisi dei dati in-silico da un lato consente di migliorare l'efficienza e l'efficacia dell'attività di ricerca e dall'altro, conseguentemente, di ridurre l'impatto delle sperimentazioni di laboratorio e cliniche favorendo l'ottimizzazione della selezione delle molecole attive, la simulazione dei sistemi biologici cellulari e sub-cellulari, l'identificazione di nuovi target diagnostici e prognostici e di pazienti candidati ai trials clinici. Inoltre, l'integrazione dati non riguarda solo le informazioni di biologia molecolare. L'analisi della variabilità genetica individuale e delle mutazioni puntiformi, nonché delle relative conseguenze funzionali, e l'analisi delle correlazioni con i dati clinici sono studi fondamentali per la medicina personalizzata che promette di affrontare con successo molte delle attuali problematiche di inefficacia delle cure somministrate in maniera indiscriminata, o meglio non individualizzata.

A fianco delle attività legate prevalentemente alla ricerca di base, si sta infatti affermando anche un settore di interesse traslazionale e clinico, la Bioinformatica Clinica. L'integrazione delle informazioni cliniche dei pazienti oncologici con informazioni genomiche può effettivamente orientare la pratica diagnostica e terapeutica alla medicina personalizzata.

Risultati e prodotti 2009

Il primo anno di attività è stato un anno di preparazione. Le attività sono consistite nell'assestamento degli strumenti esistenti e nella loro promozione sia tramite corsi di formazione / aggiornamento che con nuova documentazione sul sito web.

In questo anno, si è provveduto in particolare a:

- controllare e rivedere il portale biowep (Bioinformatics Workflow Enactment Portal, <http://bioinformatics.istge.it:8080/biowep/>), aggiornando il software relativo all'esecuzione dei workflow con la versione più recente di Taverna;
- controllare il funzionamento dei workflow presenti nel portale biowep e aggiornarli sulla base delle nuove API disponibili per i sistemi informativi utilizzati;
- sviluppare nuovi workflow in supporto alla genomica funzionale, alla gestione dei dati della Cell Bank IST e all'analisi delle mutazioni del gene umano TP53;
- rivedere, perfezionare e ampliare i Web Services da noi realizzati per l'accesso automatico (da software) ai database CABRI (si veda <http://www.cabri.org/>), al database IARC TP53 Somatic Mutations, da noi installato in ambiente SRS (si veda <http://srs.o2i.it/srs71/>) e al sistema SWS (SRS by WS) per l'accesso trasparente a tutti i database disponibili nei siti SRS pubblici.

I Web Services ottimizzati e, nel loro insieme, denominati IST Bioinformatics Web Services (BWS) sono stati documentati e messi a disposizione pubblicamente su un sito web apposito (<http://bioinformatics.istge.it/bws/>); sono stati anche pubblicati nel sito di BioCatalogue (<http://www.biocatalogue.org/>), che comprende i più noti Web Services in ambito bioinformatico.

Inoltre, alcuni dei workflow più interessanti e significativi sono stati inseriti nel sito myExperiment (<http://www.myexperiment.org/>), che comprende un archivio di workflow per le scienze della vita.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Per quanto riguarda la promozione di questi software e, più in generale, della metodologia di analisi dati tramite workflow, abbiamo avviato alcune attività formative e, in particolare, abbiamo:

- contribuito, in collaborazione con la S.S. Genomica Funzionale IST, all'organizzazione del corso "Analisi di dati di espressione genica generati con microarray", tenendo anche una lezione su "Automazione di procedure d'analisi tramite workflow";
- contribuito, in collaborazione con l'Istituto di Scienze dell'Alimentazione del CNR di Avellino, all'organizzazione di un corso su "Bioinformatica per la Proteomica", tenendo anche una lezione su "Automazione delle procedure d'analisi dati in ambito distribuito per la proteomica".

Pubblicazioni

Burger A.-Romano P.-Paschke A.-Splendiani A.
Semantic Web Applications and Tools for Life Sciences, 2008 (Preface).
BMC Bioinformatics 10(suppl 10):S1/1;S1/2, 2009

Corradi L.- Mirisola V.-Porro I.-Tortorolo L.-Fato M.-Romano P.-Pfeffer U.
Survival Online: a web-based service for the analysis of correlations between gene expression and clinical and follow-up data.
BMC Bioinformatics 10(suppl 12):S10;1/S10;10, 2009

Romano P.-Manniello A.-Aresu O.-Armento M.-Cesaro M.-Parodi B.
Cell Line Data Base: structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines.
Nucleic Acids Res. 37:D925/D932, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Nel corso del 2010, contiamo di portare avanti lo sviluppo di nuovi tool d'analisi, basati su workflow, e di continuare a svolgere attività di formazione e aggiornamento.

Intendiamo in particolare proporre applicazioni pratiche delle tecnologie coinvolte in collaborazione con la S.S. Genomica Funzionale IST analizzando le procedure utilizzate dalla struttura, definendo le migliori modalità per la loro automazione e, nello stesso tempo, studiando diverse modalità di implementazione, più adatte all'automazione stessa. Questa attività sarà necessariamente affiancata dalla progettazione e implementazione di nuovi sistemi informativi di supporto all'automazione delle procedure d'analisi dati per la genomica, in grado di consentire la riproducibilità delle analisi e il riutilizzo dei risultati intermedi, nonché dalla progettazione e implementazione di sistemi informativi e strumenti software complementari di interesse e utilizzo più generali. Analoghi approcci saranno messi in atto per l'automazione delle procedure d'analisi in proteomica, in collaborazione con la struttura IST Biopolimeri e Proteomica.

Sia le procedure automatizzate, sia gli strumenti sviluppati, potranno essere oggetto di pubblicazione, saranno debitamente documentati e presentati tramite sito web, e potranno costituire un utile ausilio a livello internazionale per ricercatori impegnati per procedure analoghe.

Continuerà inoltre l'attività formativa e divulgativa, quest'ultima attraverso la partecipazione a convegni scientifici dove saranno presentati i risultati delle nuove procedure sviluppate. Per il 2010 è già stato definito un programma formativo intenso che comprende, tra l'altro, la riedizione del corso di Bioinformatica per la Proteomica, un nuovo corso sull'analisi dei dati di Comparative genome hybridization e SNP-array, e un corso di "Introduzione allo sviluppo di applicazioni basate su tecnologie del Semantic Web in ambito biomedico".