

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 corioide 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.c. Patologia molecolare integrata (U. Pfeffer); s.c. Genetica ed epigenetica 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 corioide 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 2010 - Programmazione 2011

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 rivolto 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 2010

a) Dopo un iniziale periodo di messa a punto della metodica FISH (Fluorescence in situ Hybridization) per l'identificazione di anomalie cromosomiche (monosomia del cromosoma 3- bcl6 e polisomia del cromosoma 8 c-myc) correlate a una prognosi sfavorevole nel melanoma uveale, si è passati all'analisi dei campioni.

Sono stati analizzati 85 casi di melanoma oculare di cui 25 con aspirato (FNBS) e sezioni istologiche incluse in paraffina e 60 con solo sezioni istologiche incluse in paraffina.

Gli ultimi 10 casi, la cui diagnosi istologica è stata eseguita presso il Servizio di Anatomia Patologica dell'Ospedale Galliera, sono ancora in valutazione.

Dei rimanenti 75 casi sono state evidenziate le seguenti aberrazioni cromosomiche:

- 20 casi (27%) con disomia di entrambi i cromosomi 3 e 8
- 32 casi (42%) con monosomia del cromosoma 3 e disomia del cromosoma 8
- 18 casi (24%) con monosomia del cromosoma 3 e polisomia del cromosoma 8

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Per 60 pazienti con follow up variabile da 1 anno a 2 anni e 1/2 le alterazioni cromosomiche sono state correlate con lo sviluppo di metastasi. 10 pazienti che presentavano anomalie cromosomiche hanno sviluppato metastasi e di questi 5 sono viventi e 5 deceduti.

I risultati ottenuti dall'analisi molecolare effettuata su materiale citologico, per i casi in cui era stato possibile avere entrambi, sono stati confermati sul tessuto paraffinato.

Si prevede di continuare la casistica sino al raggiungimento di circa 100 casi.

Si prevede inoltre di eseguire l'analisi cromosomica, sempre mediante metodica FISH, delle alterazioni del cromosoma 6 la cui valutazione è utile nei casi dubbi per le precedenti anomalie.

Infine saranno correlati i dati ottenuti con le caratteristiche morfologiche e fenotipiche della neoplasia e sarà evidenziato il loro possibile significato come indicatore prognostico di sviluppo metastatico. Questo al fine di individuare gruppi di rischio su cui concentrare l'utilizzo di terapie adiuvanti.

b) Per la valutazione immunohistochimica della proteina p16 e delle delezioni del locus 9p21, sono stati identificati con analisi retrospettiva 40 casi di pazienti con nevi di difficile diagnosi istopatologica, casi di nevo displastico, casi di nevo di Spitz/ Reed, e casi con melanoma sottile (spessore non superiore ai 2 mm), casi con linfonodo sentinella positivo e successiva linfadenectomia negativa, casi con sentinella positivo e successiva linfadenectomia positiva. La valutazione della perdita e/o variazione della proteina p16 con tecniche di immunohistochimica è stata eseguita su 20 casi e di ognuno è stata valutata l'espressione con tre differenti parametri: nucleare e citoplasmatica, solo citoplasmatica e assenza di colorazione. I risultati sono ancora all'analisi. E' stata inoltre messa a punto la metodica FISH con l'utilizzo della sonda specifica per il gene CDKN2A sulle sezioni dei casi inclusi in paraffina.

Su questi casi è stata inoltre eseguita la metodica FISH (Fluorescence in situ Hybridization) utilizzando il melanoma FISH probe set allo scopo di rilevare, tramite la fluorescenza multicolore, il numero di modifiche nelle copie dei geni RREB1 (6p25), MYB (6q23), CCND1 (11q13) e cromosoma 6 (6p11.1-q11.1) che comunemente sono aberranti nel melanoma (analizzate mediante CGH, FISH e Microarray). Tale analisi viene effettuata su casi ambigui all'analisi morfologica.

Pubblicazioni

Salvi S.-Scopsi L.

La FISH nella gestione dei pazienti con melanoma oculare.
Dermatol. Amb., Anno XVIII – n. 1 gennaio/marzo 2010

Presentazioni a congressi

Boccardo S.-Salvi S.-Anselmi L.-Gualco M.-Queirolo P.-Truini M.

Indagini molecolari (Melanoma Probe FISH) nella diagnostica differenziale delle lesioni melanocitarie. Casistica Ist e ASL.3

Poster al XXXV Incontro di Istopatologia Dermatologica, Fondazione Sandretto Re Rebaudengo, Torino 18 e 19 marzo 2010

Indagini molecolari (FISH) nel melanoma dell'uvea: caratteristiche ed applicazioni in oncologia oftalmologica. Casistica IST

Relazione al convegno Melanoma. La genetica molecolare dalla ricerca alle applicazioni cliniche, Firenze, 12 e 13 novembre 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

a) In collaborazione con l'ospedale Galliera di Genova, si intende, proseguire la raccolta dei casi di melanoma uveale sino ad una casistica di 100 pazienti su cui eseguire la tecnica FISH per valutare la monosomia del cromosoma 3 e la polisomia del cromosoma 8. Per questi casi prospettici verrà esaminato in contemporanea (dove possibile) sia aspirato che le sezioni istologiche incluse in paraffina, al fine di confermare la validità delle metodiche eseguite su preparati istologici e citologici. Si intende inoltre applicare la metodica FISH alle aberrazioni del cromosoma 6 correlate con prognosi favorevole e applicabile dove presente una sola delle precedenti alterazioni. Infine i risultati prognostici dei dati ottenuti saranno inseriti all'interno di un database e correlati con le altre caratteristiche dei singoli pazienti.

B) Si intende ampliare la casistica selezionata sino ad un numero di 100 pazienti. Si proseguirà nella valutazione immunohistochimica della localizzazione (nucleo e/o citoplasma) della proteina p16. Su tutti i casi verrà eseguita l'analisi della delezione della regione 9p21 mediante la metodica FISH con l'utilizzo della sonda specifica per il gene CDKN2A (sezioni incluse in paraffina). In seguito si procederà all'abbinamento dei risultati ottenuti con le diagnosi istologiche ed alla eventuale revisione dei preparati istologici con i dati discordanti. Questi dati possono essere di potenziale valore per pianificare il trattamento chirurgico del melanoma (% di riduzione di pazienti sottoposti a linfadenectomia).

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

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

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

Altre strutture IST partecipanti: s.s. Diagnostica molecolare (S. Zupo); s.s. Mutagenesi molecolare e riparazione del DNA (G. Frosina); s.c. Trasferimento genico (A. Daga); s.c. Genetica ed epigenetica 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 Liguro 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 interfascica 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 2010

Per quanto concerne i tumori ematologici, su di un campione di sessanta pazienti affetti da mieloma multiplo, è stato operato un confronto tra i dati di citogenetica ed i dati clinici. Da questo confronto è emerso che non esiste alcuna correlazione tra le anomalie cromosomiche prese in considerazione e la sopravvivenza dei pazienti, che peraltro risulta ancora piuttosto elevata (75%). La sopravvivenza media dalla terapia è 57 mesi e il follow up mediano è di circa 30

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

mesi. Su 49 pz, età mediana 63 anni, si è osservata una buona risposta alla terapia nel 41% circa dei casi. Confrontando le anomalie cromosomiche riscontrate con la risposta alla terapia negli stessi pazienti non sembra esserci alcuna correlazione. Tuttavia, il limitato tempo di osservazione sommato al numero ancora ridotto di pazienti, nonché le differenti terapie a cui gli stessi sono stati sottoposti non ci permettono ancora di trarre delle conclusioni definitive. Inoltre, come emerge anche da altri studi, il trapianto autologo di midollo osseo e le nuove terapie sembrano aver molto migliorato la prognosi dei pazienti affetti da mieloma multiplo, anche di quei pz che presentano fattori prognostici negativi. Questo studio è stato oggetto di tesi di laurea magistrale presso l'Università di Genova. E' proseguito lo studio sulle cellule staminali tumorali valutando il loro assetto cromosomico nel mesotelioma. Dallo studio è emerso che presentano le stesse anomalie cromosomiche già riscontrate nelle cellule tumorali non-staminali di questa neoplasia, con una presenza di anomalie cromosomiche che contraddistinguono i tumori invasivi. Lo studio è stato oggetto di pubblicazione.

Pubblicazioni

Melotti A.-Daga A.-Marubbi D.-Zunino A.-Mutti L.-Corte G.

In vitro and in vivo characterization of highly purified human mesothelioma derived cells.
BMC Cancer 10:54;1/54;9, 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Per quanto concerne il mieloma multiplo, si valuteranno anche altre anomalie cromosomiche, si procederà nella raccolta dei casi e nel confronto con i dati clinici dei pazienti, prendendo in considerazione anche altri parametri clinici e suddividendo i pazienti in gruppi più omogenei.

Anche nel caso dei tumori cerebrali (gliomi), oltre a proseguire la raccolta dei casi, nei quali valutare la presenza di anomalie cromosomiche, si reperiranno anche i dati clinici. In questo modo sarà possibile confrontarli sia con i dati da noi ottenuti, sia con quelli di altre strutture partecipanti al fine di identificare il fattore o l'insieme di fattori che ci consentano di predire l'andamento della malattia.

In collaborazione con altre strutture dell'Istituto, si proseguirà lo studio dell'assetto cromosomico delle cellule tumorali staminali e non-staminali.

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, Sandra Salvi, Gennaro Pasciucco

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

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

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.

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 endometrioidi.

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 endometrioidi.

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; Hulpap 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.

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Risultati e prodotti 2010

Sono state eseguite le indagini per evidenziare l'eventuale presenza di una componente di tipo neuroendocrino, secondo le procedure di cui al progetto, sui 50 casi raccolti negli anni 2001-2008 congiuntamente dalla nostra struttura e dalla u.o. Anatomia Patologica Universitaria, A.O.U. San Martino di Genova (referente Prof. Ezio Fulcheri).

Essi sono così riassumibili:

1) 25 casi (Anatomia e Istologia Patologica dell'Università di Genova) di cui:

- 15 carcinomi ad istotipo sieroso
- 5 carcinomi ad istotipo endometrioidale
- 3 carcinomi scarsamente differenziati
- 1 carcinoma misto
- 1 NSC-NEC

2) 25 casi (Anatomia e Citoistologia Patologica IST di Genova) di cui:

- 18 ad istotipo sieroso
- 6 ad istotipo endometrioidale
- 1 adenocarcinoma scarsamente differenziato

I risultati ottenuti sono i seguenti:

A) 21 casi (42%) sono risultati negativi per Cromogranina A e Sinaptofisina

B) 29 casi (58%) sono risultati positivi per almeno uno dei marcatori utilizzati. Tra questi:

- 6 casi (12% del totale, 21% dei casi positivi) con positività di entrambi i marcatori.
- 16 casi (32% del totale, 55% dei casi positivi) con positività della sola Cromogranina A.
- 7 casi (14% del totale, 24% dei casi positivi) con positività della sola Sinaptofisina.

Inoltre:

- in 4 casi (8% del totale, 14% dei casi positivi): componente neuroendocrina >30% della massa neoplastica totale.
- in 25 casi (50% del totale, 86% dei casi positivi): componente neuroendocrina <30% della massa neoplastica totale.
- in 5 casi (10% del totale, 17% dei casi positivi) si è evidenziato un pattern di accrescimento solido (in 2 focalmente).
- in 24 casi (48% del totale, 83% dei casi positivi), si è evidenziato un pattern in forma di singole cellule sparse.

Take home messages:

- la differenziazione neuroendocrina nei tumori sierosi ed endometrioidi è relativamente frequente 29/50.
- in 4/50 casi la componente endocrina era >30% (cut off per carcinoma endocrino misto secondo la letteratura).
- non esiste attualmente in letteratura un cut-off per definire "miste endocrine-esocrine" le neoplasie ovariche.
- Cromogranina A dimostrerebbe maggiore sensibilità di Sinaptofisina.
- significato biologico della componente neuroendocrina è da valutare con studi di follow-up.

I casi di neoplasia ovarica di derivazione dall'epitelio di superficie (Epithelial-stromal type) pervenuti alla s.c. di Anatomia e Citoistologia Patologica dell'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (IST) di Genova per le attività di diagnostica routinaria (anche intraoperatoria) nel corso dell'anno 2010 (in numero di 14) sono stati aggiunti ai 50 già studiati e su di essi sono in corso le indagini per evidenziare l'eventuale presenza di una componente di tipo neuroendocrino, secondo le procedure di cui al progetto.

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Nel corso dell'anno 2011 si continuerà la raccolta dei casi che perverranno in entrambi i centri che aderiscono al progetto, aggiungendoli a quelli già raccolti.

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

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

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 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 mieloablativo).

Risultati e prodotti 2010

Nel corso del 2010 sono stati arruolati 102 nuovi pazienti con B-CLL. Inoltre, 20 pazienti già esaminati in precedenza sono stati ricontrollati in occasione di un aggravamento o previsione di inizio di terapia. In questo nuovo gruppo di 102 pazienti la frequenza delle aberrazioni cromosomiche non si discosta da quella dell'intera popolazione dei pazienti B-CLL esaminata finora (del 11q22: 10%; trisomia 12: 17%; del 13q13:47%; del 17p13:8%). Per quanto riguarda i 44 pazienti con prelievi successivi, generalmente i prelievi di controllo presentavano le aberrazioni già presenti nel prelievo precedente, anche se spesso i prelievi successivi mostravano una più alta percentuale di cellule positive. Sarà necessario seguire nel tempo questi pazienti per correlare l'eventuale aggravamento e/o sopravvivenza con l'aumentare del clone neoplastico.

Per verificare l'associazione tra trisomia 12 e trisomia 18 e/o 19 sono stati esaminati fino ad ora con le sonde per i cromosomi 18 e 19 rispettivamente 50 e 42 casi. La frequenza della trisomia 18 e trisomia 19 in pazienti che già mostravano la trisomia 12 risulta essere molto simile (16% e 18%, rispettivamente) anche se solo 4 campioni presentavano contemporaneamente la trisomia 18 e la trisomia 19. E' stato inoltre studiato l'effetto di un farmaco in grado di indurre una massiva apoptosi (via riattivazione di p53) su una linea di tumore mammario che, parimenti alle B-CLL, presenta resistenza all'apoptosi. E' stata evidenziata una redistribuzione nucleolare di p53 in queste cellule, accompagnata da una diminuzione di p53. Questo suggerisce un possibile meccanismo di sensibilizzazione in cellule altrimenti resistenti al trattamento con farmaci antineoplastici. La stessa linea cellulare è stata usata per testare alcuni estratti di specie vegetali che, in vitro, hanno mostrato attività simile al tassolo. E' stato inoltre messo a punto un metodo per valutare in vitro l'azione di sostanze che agiscono sulla tubulina, per poter testare estratti di cellule vegetali con probabile attività tassano simile.

Pubblicazioni

Russo D.-Fronza G.-Ottaggio L.-Monti P.-Perfumo C.-Inga A.-Iyer P.- Gold B.-Menichini P.

XRCC1 deficiency influences the cytotoxicity and the genomic instability induced by Me/lex, a specific inducer of N3/methyladenine.

DNA Repair (Amst) 9: 728/736, 2010

Russo D.-Ottaggio L.-Penna I.-Foggetti G.-Fronza G.-Inga A.- Menichini P.

PRIMA/1 cytotoxicity correlates with nucleolar localization and degradation of mutant p53 in breast cancer cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 402: 345/350, 2010

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Presentazioni a congressi

Russo D.-Ottaggio L.-Penna I.-Foggetti G.-Fronza G.-Inga A.-Masini M.-Masiello P.-Menichini P.
Nucleolar localization and degradation of mutant p53 correlate with cell death induced by PRIMA-1 in MDA-MB-231 breast cancer cells.

Instabilità genetica e riparazione del DNA: nuovi paradigmi per la ricerca traslazionale, Roma, 15-16 Novembre 2010

Monti P.-Menichini P.-Ottaggio L.-Inga A.-Russo D.-Iyer P.-Gold B.-Fronza G.

Role of Translesion Synthesis Polymerases in the mutagenicity of Me-lex induced lesions.

Instabilità genetica e riparazione del DNA: nuovi paradigmi per la ricerca traslazionale, Roma, 15-16 Novembre 2010

Russo D.-Fronza G.-Ottaggio L.-Monti P.-Inga A.-Gold B.-Menichini P.

XRCC1 deficiency increases cytotoxicity and genomic instability induced by Me-lex, a sequence selective N3-adenine methylating agent.

Instabilità genetica e riparazione del DNA: nuovi paradigmi per la ricerca traslazionale, Roma, 15-16 Novembre 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

La casistica raccolta dal 2004 comprende più di 400 pazienti ed è stata analizzata mediante FISH con sonde specifiche per del 11q22; del 13q13; del 17p13; trisomia 12. Durante il 2011 si prevede di continuare ad ampliare la casistica e di valutare la presenza di trisomia 18 e 19 sui 72 pazienti con trisomia 12 attualmente arruolati nello studio. Parimente la frequenza di queste trisomie sarà valutata in un gruppo di pazienti senza aberrazioni ed in un gruppo con aberrazioni diverse (del 11q22; del 13q13; del 17p13). I risultati saranno correlati con le caratteristiche cliniche e con il follow up dei pazienti nei vari gruppi, al fine di stabilire se l'associazione fra queste trisomie è in grado di evidenziare pazienti che vanno incontro all'evoluzione della patologia o necessitano di terapia, rivestendo quindi carattere prognostico. Saranno valutati anche quei pazienti di cui viene richiesto un controllo in prelievi successivi.

Proseguirà inoltre lo studio di molecole in grado di riattivare p53 mutata ed indurre quindi morte cellulare in cellule resistenti a farmaci antineoplastici.

E' previsto inoltre l'isolamento e la caratterizzazione di nuove molecole con meccanismo d'azione simile al tassolo ed identificazione di nuovi precursori per la semisintesi del tassolo e tassotere. Tali molecole verranno caratterizzate dal punto di vista dell'attività in vitro sulla tubulina e dell'attività antimitotica su cellule in vitro.

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.c. Patologia molecolare integrata (U. Pfeffer); s.s. Banca biologica e cell factory (B. Parodi, M.A. Manniello); s.s. Biopolimeri e proteomica (M. Rocco, A. Profumo)

Altri Enti coinvolti: Dip. di Informatica, Sistemistica e Telematica, DIST, Università di Genova (M. Giacomini); Istituto Scienze delle Alimentazione, CNR, Avellino (A. Facchiano); Softeco Sismat, Genova (G. Viano); Rothamsted Research, Harpenden, UK (A. Splendiani); International Agency for Research on Cancer, IARC, Lione (M. Olivier); Dip. di Informatica Medica, Università di Pavia (R. Bellazzi); Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna (L. Sangiorgi)

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.

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

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 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 2010

Nel corso del secondo anno di attività, le attività sono consistite nello sviluppo di workflow automatici a supporto di alcune attività di ricerca svolte in Istituto e nella promozione di questi strumenti. Non è stato possibile avviare progetti finalizzati collegati a questa attività perché non sono stati ancora resi noti i risultati delle relative richieste di finanziamento.

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

A titolo d'esempio, si riporta la descrizione di un workflow il cui obiettivo è l'analisi comparativa di subset di proteine coinvolte nel mantenimento delle cellule staminali. Le proteine da analizzare sono indicate in input tramite i loro identificativi UniProt. Il workflow implementa una procedura complessa che, dapprima, determina gli allineamenti multipli delle sequenze coinvolte e, quindi, ricostruisce gli alberi filogenetici per ogni singolo allineamento, tramite bootstrapping. L'output finale del workflow è costituito dagli allineamenti e dagli alberi. Tutte le elaborazioni sono eseguite in remoto: i server remoti vengono interrogati tramite Web Services. Sono stati utilizzati cinque programmi di allineamento multiplo di sequenze: emma-ClustalW, ClustalW2, MAFFT, Muscle e T-Coffee. Anche l'analisi filogenetica è stata realizzata in remoto utilizzando algoritmi neighbor-joining e maximum-likelihood con PHYLIP.

Il workflow si è dimostrato utile per lo studio delle relazioni filogenetiche tra proteine appartenenti a organismi diversi. L'analisi dei risultati suggerisce che una netta separazione tra cladi animali e vegetali non è possibile. Questo approccio, rendendo automatica l'esecuzione di procedure ripetitive e diminuendo quindi i tempi e lo sforzo necessari, ha permesso di utilizzare diversi metodi d'analisi e di confrontare i risultati ottenuti con diversi algoritmi, rendendo così complessivamente più stabile e accurata l'analisi. Inoltre, in futuro sarà possibile ripetere facilmente e in tempi brevi le analisi effettuate, cosa che risulta necessaria, visto il rapido sviluppo dei database utilizzati. Il workflow, del quale esistono due versioni, è disponibile sul sito myExperiment.org.

L'attività formativa si è concretizzata nell'organizzazione dei seguenti corsi:

- Sviluppo di applicazioni basate su Semantic Web, IST, Genova, 15-17 Marzo 2010,
- Virtual Karyotyping attraverso SNP array: analisi dati, IST, Genova, 25-27 Ottobre 2010,
- Bioinformatica per la Proteomica, IST, Genova, 18-20 Ottobre 2010.

Pubblicazioni

Romano P.-Crescenzi M

Rete Nazionale di Bioinformatica Oncologica (RNBIO).

In: Programma Straordinario Oncologia 2006. Art. 3 "Rete nazionale solidale e collaborazioni internazionali (ISS per ACC)". Consuntivo dell'attività scientifica (2008-2009). Moretti F, Guderzo A, Ferrigno A, Belardelli F (eds) Rapporti ISTISAN 10/1, pp. 75-83, 2010

Zappa A.-Miele M.-Romano P.

IBWS: IST Bioinformatics Web Services.

Nucleic Acids Res. 38(suppl):W712/W718, 2010

Splendiani A.-Burger A.-Paschke A.-Romano P.-Marshall M.S.

Biomedical semantics in the Semantic Web.

J. Biom. Semantics, in press

Libri e capitoli di libro

Romano P, Milanese L.

Complex Search, Ranks, and Biological Discovery: a User's Perspective.

In Ceri S, Brambilla M (eds). Search Computing II. LNCS 6585. Springer Verlag Berlin Heidelberg, in press

Presentazioni a congressi

Marshall M.S.-Burger A.-Romano P.-Paschke A.-Splendiani A. (eds.)

Semantic Web Applications and Tools for Life Sciences 2009.

Proc. 2nd Intl Workshop SWAT4LS 2009, Amsterdam, The Netherlands, November 20, 2009

in CEUR Workshop Proceedings, January 19, 2010

Miele M.-Zappa A.-Romano P.

An effective Workflow for automated comparative analysis,

in Proceedings of BITS 2010, 7th Annual Meeting of the Bioinformatics Italian Society, Attimonelli M, D'Elia D, Pesole G (eds.), Bari, Italy, April 14-16, 2010

Romano P.

Joint NETTAB 2010 and BBCC 2010 workshops on Biological Wikis: rationale and organization,

in "Network Tools and Applications in Biology NETTAB-BBCC 2010 Biological Wikis", Facchiano A, Romano P (eds), Napoli, Italy. November 29 – December 1, 2010

Romano P.

Italian Network for Oncology Bioinformatics - RNBIO,

in "Network Tools and Applications in Biology NETTAB-BBCC 2010 Biological Wikis", Facchiano A, Romano P (eds), Napoli, Italy. November 29 – December 1, 2010

Zappa A.-Miele M.-Romano P.

An effective Workflow for automated comparative protein sequences analysis.

in Poster & Demonstration Proceedings, 7th International Conference on Data Integration in the Life Sciences (DILS 2010), Kemp GJL, Lambrix P (Eds.). Gothenburg, Sweden, p 5-8, August 25-27, 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Nel corso del 2011, contiamo di completare lo sviluppo di nuovi tool d'analisi, basati su workflow, e di continuare a svolgere attività di formazione e aggiornamento.

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Intendiamo in particolare introdurre concretamente nelle procedure automatiche che svilupperemo il supporto di strumenti semantici, quali le ontologie biomediche, e orientare l'analisi allo studio delle variazioni del genoma umano, puntando così alle esigenze della bioinformatica clinica che si propongono di stabilire un collegamento tra genotipo e fenotipo in grado di orientare diagnosi, prognosi e, in prospettiva, trattamento al corredo genomico e proteomico individuale.

Questa attività sarà svolta in collaborazione con il gruppo di Magali Olivier dello IARC di Lione, con il quale esiste già una collaborazione per la gestione di una implementazione SRS del database delle mutazioni somatiche del gene umano TP53. Si prevede inoltre di attivare una collaborazione con il Dipartimento di Informatica Medica dell'Università di Pavia, con il quale si sta organizzando il workshop internazionale NETTAB 2011 "Clinical Bioinformatics" (Pavia, 12-15 Ottobre 2011), e con il gruppo di Bioinformatica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli, con il quale si sta attualmente collaborando nell'ambito della Rete Nazionale di Bioinformatica Oncologica.

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 l'attività formativa e divulgativa. Per il 2011, è stato definito un programma formativo di massima che comprende a) la terza edizione del corso di Bioinformatica per la Proteomica, che probabilmente si terrà a Bologna, presso il CINECA, e rispetto al passato introdurrà le nozioni sulle possibilità offerte da rete Grid e supercalcolo nell'analisi dei dati di proteomica; b) un corso sull'analisi dei dati di sequenziamento di seconda generazione, che si terrà a Genova e sarà la prosecuzione ideale dei corsi degli anni scorsi sull'analisi dell'espressione genica e degli SNP array; c) una seconda edizione del corso di Biostatistica per la Bioinformatica, che si svolgerà nuovamente a Milano, in collaborazione con l'INT.