

I biomarcatori tumorali

settembre 2008

di G. Buonsanti ✉

Tipologia: rassegna monografica in italiano

Abstract: l'obiettivo che si persegue quando si scoprono e si mettono a punto nuovi marcatori tumorali è quello di avere a disposizione dei test semplici e non invasivi in grado di indicare il rischio di sviluppare un tumore, di effettuare una prognosi accurata in caso di tumore già presente, di predire l'efficacia di una terapia piuttosto che di un'altra e di aiutare il medico nella decisione circa il dosaggio di agente terapeutico utilizzato. I marcatori tumorali oggi in uso nella pratica clinica non sempre rispondono a tutti questi requisiti; i recenti progressi nella conoscenza dei meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza e della progressione dei tumori, insieme ai progressi in campo biotecnologico, rendono oggi possibile lo sviluppo di una nuova generazione di biomarcatori tumorali in grado di soddisfare i requisiti indicati e recare beneficio al paziente oncologico.

::I marcatori tumorali::

Il tumore è la rappresentazione fenotipica finale risultante dall'**accumulo** e dalla stratificazione nello stesso clone cellulare di **diverse alterazioni genetiche** ed epigenetiche. Tali alterazioni genetiche modificano il clone stesso ed il suo microambiente rendendolo capace di proliferazione incontrollata, elusione del sistema immunitario, capacità invasiva e capacità angiogenetica.

Queste stesse alterazioni genetiche, che da un lato conferiscono oncogenicità al clone in via di trasformazione o trasformato, dall'altro producono invariabilmente **strutture molecolari nuove** e specifiche di quel tumore in quella fase del suo sviluppo: proteine mutate, chimeriche, enzimi caratterizzati da incremento o decremento funzionale ecc.

Tali strutture molecolari "nuove" e "caratteristiche" di ogni determinato tumore possono essere studiate, analizzate ed utilizzate per seguire l'andamento del tumore, stabilirne la prognosi, predire il successo di una strategia terapeutica piuttosto che di un'altra, stabilire i corretti dosaggi dell'agente terapeutico: possono cioè essere utilizzati come marcatori biologici del tumore o "**marcatori tumorali**".

::Storia dei marcatori tumorali::

Il primo marcatore tumorale può essere considerata la **proteina di Bence Jones**, presente in elevate quantità nelle urine di soggetti affetti da mieloma multiplo e studiata sin dalla metà del XIX secolo; successivamente il ruolo di marcatori tumorali è stato assunto dagli **ormoni** e dagli **enzimi** che, presenti in elevate quantità, sono indicatori "di

massa" rispetto al tessuto che li produce: ad esempio, una la rilevazione di eccessive quantità di prolattina possono indicare un adenoma ipofisario, così come eccessive quantità di fosfatasi acida prostatica, un enzima prodotto dalla prostata, possono indicare la presenza di una massa a crescita incontrollata proprio in quella sede; gli esempi di enzimi ed ormoni utilizzati come "spie" di massa sono numerosissimi ed a tutt'oggi queste molecole vengono efficacemente utilizzate come marcatori biologici di tumore. Con l'avvento dello studio dei cromosomi si scoprì l'associazione tra il **cromosoma Philadelphia** e la leucemia mieloide cronica: come è noto, una traslocazione cromosomica può portare alla formazione di un prodotto di fusione tra i cromosomi 9 e 22: l'unione avviene in una regione che ospita un gene coinvolto nel controllo della proliferazione cellulare il quale, disregolato, avvia il processo di trasformazione maligna. Tale alterazione cromosomica è nota per essere alla base dell'insorgenza della leucemia mieloide cronica e di alcune altre forme di leucemia. L'analisi dell'assetto cromosomico, oggi possibile con metodologie di routine, consente in questo caso di individuare il cromosoma Philadelphia che può pertanto essere definito a tutti gli effetti un marcatore tumorale.

Negli anni '60 vengono scoperti ed entrano nella pratica clinica gli **antigeni embrionofetali**: l'alfa 1 fetoproteina (AFP), l'antigene carcino-embrionario (CEA), l'antigene polipeptidico tissutale (TPA). Si tratta di molecole che segnalano un parziale sdifferenziamento cellulare che in alcuni casi può essere tessuto-specifico o organo-specifico; l'incremento della loro concentrazione segnala quindi uno sdifferenziamento cellulare, che, come è noto, caratterizza il tumore in alcune fasi del suo ciclo biologico.

Negli anni '70, con l'avvento delle tecniche che sfruttavano gli anticorpi monoclonali, è stata individuata in linee cellulari tumorali umane una famiglia di biomarcatori detti **mucinici**: CA-125, CA-15-3, CA19-9. Normalmente le mucine rivestono gli epitelii formando uno strato protettivo di difesa nei confronti di agenti fisici, chimici, microrganismi, sbalzi di pH ecc. Dal momento che tali strutture svolgono un ruolo nella perdita dell'inibizione da contatto (una prerogativa dei tessuti tumorali in espansione) il loro dosaggio segnala una crescita tumorale in atto ed è un buon indicatore di massa.

Nel 1979 viene purificato il **PSA**, l'antigene prostatico specifico, un enzima proteolitico prodotto dalla prostata il cui ruolo è sostanzialmente quello di mantenere fluido il liquido seminale; ad oggi è uno dei migliori marcatori tumorali in uso nella pratica clinica, per la sua capacità di segnalare in modo specifico l'esistenza di un tumore, oltre che per il suo valore prognostico e farmacodinamico.

::I marcatori tumorali utilizzati nella pratica clinica::

I marcatori tumorali oggi utilizzati di routine nella pratica clinica sono indicati nella tabella sottostante:

<i>Biomarcatore</i>	<i>Tumore studiato</i>	<i>Altre condizioni che ne determinano l'innalzamento</i>
PSA	Prostata	Prostatite, ipertrofia prostatica benigna
PAP	Prostata	Leucemia, linfoma non-Hodgkin, osteoporosi, cirrosi, embolia polmonare

CA 125	Ovaio, utero, cervice ut.	Endometriosi, malattia infiammatoria pelvica, pancreatitici, epatopatie, mestruazioni, gravidanza
CA 15-3	Mammella, ovaio, polmone	Endometriosi, malattia infiammatoria pelvica, epatite, gravidanza, lattazione
CA 19-9	Pancreas, stomaco, tratto biliare	Pancreatite, cirrosi
CEA	Colon-retto, mammella, stomaco, polmone, pancreas, midollo, rene, tiroide, fegato, linfomi	Fumo di sigaretta, epatopatia, pancreatite, malattie infiammatorie intestinali
AFP	Fegato, testicolo, ovaio	Epatite, cirrosi, gravidanza
HCG	Testicolo, ovaio, fegato, stomaco, pancreas	Gravidanza, uso di marijuana
NSE	Neuroblastoma, tumore di Wolms, melanoma, tiroide, reni, pancreas, testicolo	
SCC	Cervice uterina	
TPA	Tumori solidi	Infiammazioni
TG	Tiroide (papillare e follicolare)	
CYFRA 21-1	Polmone (NSCLC)	
LDH	Tumori solidi e liquidi	Epatopatia, infiammazione, infarto, sindrome nefrosica
Ferritina	Fegato, linfoma di Hodgkin	Anemia sideropenica, terapia marziale
Ormoni	Tessuto di riferimento	

Lo studio di questi marcatori risponde senz'altro ad un requisito fondamentale richiesto ad ogni marcatore tumorale: la semplicità di analisi e la **non invasività** del prelievo: si tratta infatti di molecole che possono essere facilmente analizzate e dosate in laboratorio in seguito ad un semplice prelievo di sangue.

La consultazione della tabella rende chiaro tuttavia un limite di fondo di questi marcatori tumorali: la loro scarsa **specificità**. Le concentrazioni di queste molecole possono infatti variare anche in seguito a condizioni diverse dal tumore che si desidera monitorare, o, addirittura, in seguito a condizioni del tutto fisiologiche come il ciclo mestruale, la gravidanza ecc.

Inoltre, non tutti questi marcatori rispondono ai requisiti di **informatività** richiesti ad un marcatore tumorale, e cioè quelle di fornire indicazioni prognostiche, predittive e farmacodinamiche: la maggior parte di questi marcatori viene utilizzato sostanzialmente per fini farmacodinamici e comunque sempre in associazione con indagini strumentali spesso di non facile esecuzione.

Si avverte quindi la necessità di mettere a punto nuovi marcatori tumorali basati sullo studio degli **eventi genetici** che portano alla trasformazione tumorale; una nuova generazione di biomarcatori dotati, per loro stessa natura, di elevata specificità, sensibilità analitica ed informatività per guidare le scelte cliniche verso terapie molecolari mirate.

::Tipologie di marcatori tumorali::

I marcatori tumorali possono essere suddivisi in tre categorie: quelli prognostici, quelli predittivi e quelli farmacodinamici.

I **marcatori prognostici** consentono di predire il corso naturale della malattia e distinguere quella con "prognosi favorevole" da quella a "prognosi sfavorevole". Questi marcatori rispondono sostanzialmente alla domanda se trattare (e quanto aggressivamente) o non trattare un tumore. Numerosi oncogeni, geni oncosoppressori e relative proteine sono stati indicati, in centinaia di studi molecolari, come buoni indicatori prognostici per i vari tipi di tumore, ed attualmente esistono dei pattern di espressione genica (vd avanti) o delle singole proteine che vengono utilizzate ad esempio per stimare la probabilità che un carcinoma della mammella possa recidivare dopo la resezione chirurgica, guidando così la decisione circa la possibilità di avviare la paziente alla terapia sistemica oltre che fornendo indicazioni sull'evoluzione della malattia in quella determinata paziente.

I **marcatori predittivi** (o di risposta) consentono invece di predire se un paziente risponderà o meno ad una determinata terapia. Questa classe di biomarcatori risponde quindi alla domanda su quale farmaco utilizzare. Il classico esempio è quello dell'amplificazione del gene ERBB2 nel carcinoma della mammella: le pazienti con tale amplificazione beneficiano del trattamento con trastuzumab (Herceptin) mentre le pazienti in cui il recettore per gli estrogeni è espresso dal tumore rispondono al trattamento con tamoxifen. Un altro valido esempio è rappresentato dall'uso della proteina PML-RARA come biomarcatore nei pazienti con leucemia promielocitica acuta, i quali rispondono alla terapia con acido retinoico; i casi dovuti alla presenza del cromosoma Philadelphia (che contiene la proteina di fusione BCR-ABL) sono invece sensibili all'azione dell'imatinib mesilato (il Gleevec o Glivec) e quei pazienti che sviluppano resistenza al Glivec possono essere a loro volta riclassificati sulla base della presenza di specifiche mutazioni nella regione di BCR-ABL con funzioni di tirosin-chinasi la cui presenza suggerisce la suscettibilità all'azione delle molecole dasatinib e nilotinib. Ancora, la presenza di mutazioni nella regione che codifica il dominio con attività chinasi dell'epidermal growth factor receptor (EGFR) è in grado di predire la sensibilità dei tumori del polmone all'azione dell'erlotinib o del gefitinib, mentre nella stessa patologia la contemporanea presenza di mutazioni di KRAS indica l'inefficacia di questi stessi farmaci. Infine, un altro esempio è quello del glioblastoma, nel quale la presenza di particolari mutazioni nella regione che codifica per il dominio extracellulare dell'EGFR è indice predittivo di buona risposta agli inibitori dell'EGFR sopra citati ma solo nei casi in cui vi sia contemporaneamente assenza di mutazioni nel gene oncosoppressore PTEN.

I **marcatori farmacodinamici** sono quelli utilizzati più comunemente nella pratica clinica ed indicano sostanzialmente quale sia la dose di agente terapeutico più opportuna da utilizzare per quel dato paziente in quel dato momento della storia clinica del tumore.

Questi marcatori, che rispondono quindi alla domanda su quale sia il dosaggio di terapeutico più opportuno possono essere utilizzati per personalizzare una terapia non più sulla base della massima dose tollerata ma sulla base del concetto più moderno della massima dose efficace: per esempio è stato osservato che il Glivec inibisce l'attività chinasi della proteina chimerica BCR-ABL alla stessa dose necessaria per indurre la remissione clinica, che è una dose ben inferiore rispetto a quella tossica. Nei pazienti con leucemia mieloide acuta è quindi possibile utilizzare il dosaggio dell'attività chinasi di BCR-ABL come biomarcatore farmacodinamico utile a stabilire il minimo dosaggio efficace.

::I nuovi marcatori tumorali: nuove problematiche::

Nelle ultime due decadi si è osservato un incremento esponenziale degli **studi molecolari** riguardanti i tumori, studi che hanno consentito una comprensione fine di diversi meccanismi coinvolti nella genesi e nella progressione dei vari tipi di neoplasia. Ciò è stato reso possibile anche grazie a progressi considerevoli nelle **tecniche di indagine del DNA**, che hanno reso possibile l'analisi di una enorme quantità di dati in tempi brevissimi.

Ad esempio, la tecnologia del **DNA-microarray** consente di definire in modo quasi del tutto esaustivo le modificazioni cromosomiche che si sono verificate a livello somatico nel tessuto tumorale di un determinato soggetto; nel contempo, è possibile indagare simultaneamente la presenza di decine o centinaia di mutazioni puntiformi nei geni putativi coinvolti nella genesi e progressione tumorale finora noti. Insieme, queste due informazioni sono sostanzialmente in grado di fornirci una mappatura pressoché completa delle modificazioni genetiche che caratterizzano il tessuto tumorale di un individuo.

DNA-microarray. Si tratta di una tecnologia innovativa sviluppata negli anni '90, che ha consentito una vera e propria "svolta" nello studio del DNA e dell'RNA. La tecnica si basa sostanzialmente nel creare su una piccola superficie solida una collezione ordinata di sonde di DNA a sequenza nota; il supporto (microarray) sarà quindi una mappa ordinata di sequenze. Su ogni microarray vengono posizionate migliaia di sonde: è chiaro quindi che la loro produzione richiede apparecchiature robotiche molto sofisticate. Con i microarray è possibile individuare la presenza di un determinato RNA (e quindi l'attivazione di un determinato gene all'interno dell'intero genoma), la presenza di una mutazione o studiare il profilo di espressione genica, individuando cioè tutti i trascritti attivi in una sola volta. Lo studio degli RNA prevede innanzitutto la loro estrazione dalla cellula e successivamente la loro conversione in cDNA utilizzando la trascrittasi inversa; durante il processo di conversione i cDNA creati vengono marcati con una sonda fluorescente. A questo punto è possibile far avvenire la reazione di ibridazione tra questi cDNA e le sonde poste sul microarray; in caso di effettiva ibridazione sarà sufficiente rilevare il segnale fluorescente ed associarlo alla relativa posizione sul microarray per conoscere se una data sequenza era presente o meno nella miscela degli RNA di partenza. L'insieme di tutti i segnali di fluorescenza (migliaia), analizzati con appositi strumenti, fornisce il profilo completo di espressione genica di

quella cellula o tessuto.

Queste nuove strategie di indagine molecolare del tessuto tumorale suggeriscono un **cambiamento radicale** nell'approccio alla diagnosi, prognosi e terapia del tumore, con un cambiamento da un presente in cui i marcatori tumorali sono caratterizzati dall'essere spesso organo-specifici e non tumore-specifici, avere bassa specificità, essere scarsamente prognostici, scarsamente predittivi e moderatamente farmacodinamici ad un futuro di marcatori altamente specifici, prognostici, predittivi e farmacodinamici. Tale transizione pone in essere una nuova classe di problematiche, tutt'ora aperte; ne verranno qui citate tre; la progettazione di nuovi trials clinici, la non-invasività delle tecniche di prelievo dei materiali biologici e la distinzione delle alterazioni genetiche funzionali da quelle che rappresentano un "rumore di fondo" nel genotipo tumorale.

Nuovi trials clinici. Validare ed immettere nella routine clinica nuovi marcatori tumorali basati sulle alterazioni genetiche tumore-specifiche richiede la progettazione di nuovi trials clinici, con nuovi problemi di reclutamento e studio dei pazienti oncologici. Per quanto riguarda il reclutamento è necessario sottolineare che il profiling molecolare di un tumore può essere oggi talmente accurato da rendere virtualmente unico ogni carcinoma, impedendo così di individuare **classi omogenee di soggetti** nei quali avviare un trial clinico; in pratica, mancano conoscenze su come superare questo profiling spinto con biomarcatori tumorali che possano essere efficacemente utilizzati per selezionare gruppi di pazienti che possano beneficiare di una terapia piuttosto che di un'altra. Inoltre lo studio dei marcatori tumorali, necessita, per sua stessa natura, di **informazioni dinamiche**: è necessario quindi disporre di **biopsie seriate** dello stesso paziente effettuate in momenti diversi della storia clinica del suo tumore; ciò, naturalmente, è molto difficile da ottenere per i tumori solidi sia per la loro localizzazione che per l'impossibilità di programmare continue biopsie a fini di studio, molto più facile, invece, per quelli liquidi. Si ripropone in definitiva un motivo dominante in oncologia, quello delle maggiori informazioni disponibili per i tumori liquidi rispetto a quelli solidi. Un'alternativa alle biopsie seriate potrebbe essere quello di valutare farmaci sperimentali in pazienti che hanno già un intervento chirurgico programmato come parte integrante del loro trattamento; in questi casi è possibile somministrare il farmaco per un determinato periodo precedente all'intervento e quindi studiarne l'effetto confrontando il frammento bioptico ottenuto a fini diagnostici con quello prelevato in sede chirurgica, a trattamento quindi già avvenuto. Un esempio di questo approccio è il trattamento con ripamicina di pazienti con glioblastoma; la ripamicina (il cui nome commerciale è *Sirolimus*) è un inibitore di mTOR, il cui pathway aberrante nel tumore è sotto il controllo del gene oncosoppressore PTEN: i pazienti in cui manca PTEN (che inibisce la produzione di mTOR) sono sensibili al trattamento con la ripamicina; in questi pazienti il trattamento con ripamicina viene effettuato prima del secondo intervento chirurgico (comunemente pianificato dopo la resezione iniziale), l'assenza di PTEN sul frammento bioptico ottenuto durante il secondo intervento seleziona i pazienti nei quali continuare la ripamicina (in questo caso il PTEN viene utilizzato come marcatore predittivo) e la verifica dell'efficacia del trattamento avviene dosando S6 e Ki-67, due molecole che si trovano a valle del pathway di mTOR e che quindi vengono utilizzate in questo caso come marcatori farmacodinamici (la cui assenza indica praticamente l'efficacia del blocco funzionale esercitato dalla ripamicina su mTOR).

Non-invasività delle tecniche di prelievo. Una delle caratteristiche fondamentali di ogni marcatore tumorale è rappresentata dalla non-invasività del reperimento del materiale biologico da studiare. Ciò vale, naturalmente, anche per i marcatori basati sullo studio del DNA o dell'RNA; se anche si riuscisse a mettere a punto degli eccellenti marcatori molecolari dotati di elevate performances in termini di informatività, resterebbe il problema rappresentato dal fatto che per studiarli sarebbe necessario effettuare una **biopsia**. Un filone di ricerca che cerca di superare questo problema è finalizzato ad **individuare nel circolo sanguigno** del paziente cellule dei vari tumori solidi, o, in alternativa, molecole che marchino in modo accurato l'andamento del tumore; ad esempio, alcuni studi indicano che nel circolo di pazienti affetti da carcinoma della mammella è possibile rilevare la presenza di cellule tumorali e che già il loro numero sia un buon marcatore prognostico. Ancora meglio le cellule tumorali della prostata isolate nel torrente circolatorio mostrano, da prime indagini, lo stesso **pool di alterazioni genetiche** delle cellule del tumore che le ha originate (come ad esempio l'amplificazione del gene per il recettore degli androgeni); se questi studi verranno confermati queste cellule potrebbero essere utilizzate come "specchio" di quello che avviene nel tumore solido, marcandone quindi l'andamento anche in corso di terapia. Questi primi successi sono tuttavia frenati da alcune limitazioni ad oggi difficilmente superabili come ad esempio il fatto che le cellule circolanti si osservano solo nei pazienti con metastasi e, soprattutto, il loro numero sembra essere estremamente esiguo (circa 1 cellula per ml di sangue).

Riassumendo, mentre i marcatori prognostici possono essere studiati utilizzando il frammento biotipico ottenuto in fase di diagnosi vi sono oggi discrete difficoltà nello sviluppo di marcatori predittivi e farmacodinamici i quali per essere studiati necessitano di continue biopsie nello stesso paziente in corso di terapia, procedura impossibile se non in rari casi e per pazienti terminali (il cui studio introduce peraltro bias cioè una pregiudiziale dovuta appunto allo stadio della malattia). La messa a punto di marcatori predittivi e farmacodinamici sul modello animale con successivo trasferimento all'uomo non fornisce risultati incoraggianti. I risultati più incoraggianti si hanno proprio dallo studio delle cellule circolanti dei tumori solidi; ad esempio l'amplificazione del gene per la proteina target del trattamento sembra essere il linea generale un buon marcatore predittivo.

Alterazioni funzionali e "rumore di fondo". La grande mole di conoscenze acquisite in ambito molecolare grazie anche alle moderne tecnologie legate all'uso dell'informatica in campo biomedico ha consentito di individuare centinaia di strutture molecolari caratteristiche del fenotipo tumorale; tuttavia molte delle alterazioni genetiche riscontrate nei tessuti tumorali sono solo un "**rumore di fondo**" della trasformazione maligna: in altri termini non è ancora del tutto chiaro quali siano, per ogni tipo di tumore, gli eventi effettivamente cruciali per lo sviluppo e per la progressione del tumore. Alcune strategie sono risultate utili per facilitare l'opera di discernimento tra alterazioni rilevanti e "rumore di fondo":

[-] Analisi integrate dei meccanismi molecolari di disregolazione genica. Quando l'analisi dei tessuti tumorali consente di stabilire che un dato gene può essere alterato attraverso diversi meccanismi in differenti punti della sua struttura ed in momenti diversi del ciclo biologico che porta dal gene alla proteina, ciò indica con ogni probabilità che si tratta di un gene rilevante per la tumorigenesi. Un caso che si può portare ad esempio è quello del gene CDKN2A che codifica per la proteina INK4A (si tratta di un gene oncosoppressore): i

meccanismi di disattivazione sono diversi, dalla delezione della regione cromosomica 9p21 che ospita il gene (alterazioni cromosomiche) alla metilazione del promotore (mutazioni epigenetiche), fino alle mutazioni puntiformi. Se un elemento genetico è veramente importante per lo sviluppo del tumore, la pressione selettiva sul clone in trasformazione troverà il meccanismo per disregolare quel gene; osservare quindi una sua disregolazione attraverso meccanismi molecolari eterogenei consente di concludere ragionevolmente che quello è un elemento genetico importante e non un semplice "rumore di fondo".

[-] Analisi comparativa interspecie. Allo stesso modo se un gene risulta coinvolto nella tumorigenesi in specie differenti è ragionevole pensare che possa essere un elemento importante.

[-] Analisi di linee cellulari. Pur con tutte le cautele dovute al fatto che è ormai noto che linee cellulari provenienti da tumori umani sono solo dei modelli sperimentali per studi che poi necessitano di ampie conferme nel modello animale, tali modelli in vitro sono risultati finora comunque quasi invariabilmente veritieri quando si tratta di validare la funzione di un elemento genetico di interesse (ad esempio il test di interferenza con RNA in linee cellulari non fallisce nel confermare l'utilità o meno di una alterazione genetica per la progressione neoplastica).

La strada per necessaria per colmare questo gap appare oggi in salita, ma un'attenta analisi dei successi fin qui resi possibili offre spunti di riflessione sul come sia possibile individuare le alterazioni genetiche causative e distinguerle da quelle che sono rumore di fondo, in modo da utilizzare le relative molecole come antigeni per la marcatura biologica del tumore a fini diagnostici, prognostici e terapeutici. Ecco qui elencati alcuni casi di successo.

[-] Traslocazioni cromosomiche: il caso della Leucemia Mieloide Cronica. Una delle prime aberrazioni genomiche associate ai tumori fu scoperta nel 1960 da Peter Nowell e David Hungerford; la traslocazione tra i cromosomi 9 e 22 determina la formazione di un prodotto di fusione dei geni BCR e ABL. Il gene chimerico che si forma a seguito di tale traslocazione cromosomica codifica per una tirosin-chinasi disregolata che conferisce alla cellula portatrice un vantaggio proliferativo. Questa alterazione cromosomica è ormai nota per essere causativa della LMC e di alcune forme di LLA. A circa 30 anni dalla scoperta del cromosoma Philadelphia è stata sviluppata una molecola in grado di bloccare la proteina ABL espressa sotto il promotore di BCR: si tratta dell'imatinib mesilato (Glivec). Il Glivec è oggi comunemente utilizzato nella pratica clinica per trattare i pazienti con LMC positivi per il cromosoma Philadelphia. Una quota di pazienti in trattamento con il Glivec acquisisce però una resistenza al farmaco, dovuta allo sviluppo di cloni recanti una mutazione puntiforme che annulla l'effetto inibitorio dell'imatinib mesilato; recentemente altre due molecole, il nilotinib ed il dasatinib sono state approvate per la loro capacità di curare con successo i soggetti LMC Glivec-resistenti. Questo è un eccellente esempio di come la comprensione molecolare delle origini di un tumore, nella fattispecie dovuto ad un'alterazione cromosomica, abbia consentito di sviluppare dapprima un marcatore biologico (il cromosoma Philadelphia) e, successivamente, un agente terapeutico in grado di

bloccare il tumore. L'approccio reiterativo consente oggi di trattare anche i soggetti che sviluppano resistenza al farmaco e tale successo è in parte dovuto al fatto che i tessuti tumorali dei soggetti affetti e trattati con Glivec sono stati correttamente raccolti in grandi banche biologiche di tessuti che hanno consentito uno studio a posteriori della biologia delle cellule dei soggetti sensibili e resistenti al Glivec.

[-] Amplificazione genica: il caso del carcinoma della mammella.

L'oncogene ERBB2, come è noto, è amplificato in un terzo circa dei carcinomi mammari, conferendo loro un elevato grado di malignità; il prodotto genico di questo protooncogene è il bersaglio di un anticorpo monoclonale, il trastuzumab, che viene oggi usato con successo nella terapia dei tumori della mammella (selezionati appunto sulla base della presenza di amplificazione di ERBB2). Si tratta di un altro caso di successo in cui la comprensione molecolare di un meccanismo biologico ha consentito da un lato l'individuazione di un antigene da utilizzare come biomarcatore tumorale, dall'altro la messa a punto di un agente terapeutico efficace nella cura del tumore stesso.

[-] Mutazioni puntiformi: il caso di BRAF e EGFR.

Il settore maggiormente indagato, quello della ricerca di mutazioni in geni responsabili del controllo della proliferazione cellulare, ha fornito le più importanti conoscenze sull'eziopatogenesi dei tumori, ma proprio per questo è il settore in cui si avverte maggiormente la distanza tra la mole di dati ottenuti nella ricerca e l'applicazione in ambito clinico. Tra i rari casi di successo è possibile citare i trials clinici che studiano gli inibitori di BRAF, la serin-treonin chinasi mutata con elevata frequenza (60%) nei melanomi, oltre che nei carcinomi coloretali (10%) ed in altri tipi di cancro. Il trattamento con gefitinib e erlotinib, due anticorpi monoclonali che inibiscono l'EGFR (epidermal growth factor receptor) è ormai routinario in pazienti con carcinoma del polmone di tipo NSCLS (non-small cell lung carcinoma) che presentano mutazioni nel relativo gene, mutazioni utilizzate quindi come marcatore tumorale. Anche in quest'ultimo caso il successo nella messa a punto della strategia terapeutica è stato possibile grazie agli studi sui tessuti conservati.

[-] I tumori ereditari: il caso di BRCA1 e BRCA2.

Anche l'applicazione delle conoscenze acquisite nel campo della ricerca di geni che conferiscono la suscettibilità allo sviluppo di tumori su base ereditaria è piuttosto lenta ad entrare nella routine della clinica, sebbene in molti casi si conosca nel dettaglio la natura del gene alterato nella linea germinale, si conoscono gli hot-spot di mutazione e siano disponibili tutte le tecniche anche non invasive ed economiche per l'indagine molecolare. In questo caso i problemi sono sostanzialmente legati al fatto che le sindromi associate alle mutazioni germinali di geni per la suscettibilità allo sviluppo di tumori sono caratterizzate quasi sempre da penetranza incompleta ed espressività variabile ed è quindi spesso difficile stabilire un'esatta corrispondenza tra presenza di mutazione germinale, età di insorgenza e gravità della malattia; si aggiungono poi i noti problemi di natura bioetica che scaturiscono da un'indagine familiare per avere il quadro di quanto sia difficile mettere a punto metodiche standard con biomarcatori. Un caso di successo è quello dei geni BRCA1 e BRCA2, le cui mutazioni germinali sono

associate all'insorgenza di tumori della mammella; screening per la ricerca di mutazioni in questi due geni vengono oggi realizzati in diversi paesi del mondo.

::Due approcci a confronto: knowledge-driven e data-driven::

Le grandi potenzialità offerte dalla tecnologia, in particolar modo da quella dei microarray, consentono oggi di effettuare un'**analisi simultanea di migliaia di geni o di trascritti genici** in vari tipi di tumore. Ciò ha consentito di individuare dei profili di espressione genica tumore specifici, che vengono chiamati "**firma genetica**" del tumore.

Gli approcci genetici allo studio dei tumori che sono stati utilizzati finora (e che continuano ad essere utilizzati) possono essere definiti approcci **knowledge-driven**, cioè guidati dalla conoscenza: si utilizzano le conoscenze acquisite nel campo dell'oncologia molecolare per utilizzare un antigene proteico, un enzima, un RNA messaggero o un gene come marcatore tumorale prognostico, predittivo o farmacodinamico. Un approccio di nuova concezione, reso possibile grazie ai microarray, è quello "**data-driven**", cioè guidato dai dati, in cui un'analisi ad ampio spettro dei pattern di espressione genica viene realizzata e correlata a determinati tumori o a determinate caratteristiche biologiche di una sottostratificazione dello stesso tumore (es. invasività).

Uno svantaggio dell'approccio "data-driven" rispetto a quello "knowledge-driven" è rappresentato dal fatto che le alterazioni genetiche vengono considerate tutte alla stessa stregua, senza possibilità di distinguere le alterazioni effettivamente funzionali per lo sviluppo e la progressione del tumore dal "rumore di fondo". Il rovescio di questa stessa medaglia è dato dal fatto che, con questo approccio, non si introducono **bias**, cioè pregiudiziali, nel senso che fotografa una situazione genetica nel suo complesso, senza concentrarsi su geni noti e tralasciare geni che, sebbene non ancora noti perché non ancora studiati, risultano svolgere un ruolo importante nel conferire al tumore quelle caratteristiche oggetto dello studio (sviluppo, invasività, angiogenesi, risposta ad un dato agente terapeutico ecc.). Un altro motivo che rende particolarmente interessante l'approccio data-driven è la possibilità di fotografare l'assetto genetico funzionale del tumore, ignorando ad esempio la presenza di **trascritti presenti ma inattivi** in quanto recanti mutazioni puntiformi. Ad esempio, se un fattore di trascrizione è noto per avere un effetto nello sviluppo e progressione di un tumore, quel fattore di trascrizione sarà incluso in uno studio knowledge-driven. Tuttavia il gene per questo fattore di trascrizione potrebbe recare mutazioni puntiformi che diminuiscono o annullano la funzionalità del fattore di trascrizione stesso, il cui trascritto è comunque presente nelle quantità attese nella cellula. In questo caso durante una analisi knowledge-driven, la presenza di questo fattore di trascrizione verrà presa in considerazione; al contrario, l'analisi data-driven non considererà il fattore di trascrizione che, mutato, determina l'alterazione quantitativa o qualitativa di **tutti i trascritti a valle**. In questo caso l'approccio data-driven si rivela essere più "funzionale" rispetto a quello knowledge-driven. Ad esempio, un pannello di 16 geni utilizzati per la firma genetica del tumore della mammella ed ottenuto grazie a studi knowledge-driven include il gene (ESR1) per il recettore-alfa degli estrogeni (ER-alfa, un

fattore di trascrizione espresso in molti tumori della mammella), mentre un pannello di 70 geni messo a punto sempre per il tumore della mammella ma a partire da studi data-driven non include il gene ESR1 ma tutta una serie di trascritti a valle di ESR1: in questo modo viene studiato l'effetto complessivo dell'azione di quel determinato fattore di trascrizione su tutti i geni a valle piuttosto che il fattore di trascrizione di per sé.

Una interessante linea di sviluppo che unisce l'approccio data-driven a quello knowledge-driven è rappresentata dal percorso inverso rispetto a quello descritto finora, nel quale era prevista in prima istanza l'analisi del pattern di espressione genica del tumore: è infatti possibile **stabilire prima** di tutto quale sia il pattern di espressione genica corrispondente ad una determinata e nota perturbazione di una via biochimica in un dato tipo di tumore (ad esempio, si stabilisce che tumori della mammella recanti alterazioni in certi specifici oncogeni o geni oncosoppressori hanno una determinata firma genetica). Successivamente si utilizza quella firma genetica per **risalire a quale pathway biochimico è alterato** in un determinato campione tumorale di un paziente. Questa strategia consente di classificare quindi il tumore sulla base del pathway biochimico alterato piuttosto che sulla base dell'organo o del tessuto di provenienza. A questo punto è possibile pianificare una **terapia mirata per quello specifico pathway** biochimico alterato. Utilizzando questo approccio è stato ad esempio scoperto che la firma genetica ottenuta in tumori sottoposti a trattamento con ripamicina (che inibisce mTOR, una proteina del pathway di PTEN), è sovrapponibile a quella ottenuta in pazienti con leucemia linfatica acuta sensibili ai glucocorticoidi: infatti, quando testata, la ripamicina si è rivelata in grado di indurre sensibilità al trattamento con glucocorticoidi in pazienti con leucemia linfatica acuta. Ancora: come è noto meno del 35% dei tumori della mammella che esprimono ERBB2 rispondono al trattamento con transuzumab da solo; alcuni studi hanno dimostrato che il fattore che determina se un tumore ERBB2 risponderà al solo transuzumab è dato dalla presenza dell'oncosoppressore PTEN intatto (nel senso che solo i tumori che hanno PTEN intatto rispondono al solo transuzumab). Ora, dal momento che il pattern di espressione genica associato alla perdita di funzione di PTEN è noto, sarà possibile analizzare i tumori della mammella e, a seconda della loro firma genetica relativa allo status di PTEN, decidere la strategia terapeutica.

::Uno scenario nuovo: la farmacogenomica::

Negli anni passati molte terapie utilizzate per la cura dei tumori sono state messe a punto grazie a studi empirici derivati da ampi trials clinici. L'uso continuativo di questi protocolli terapeutici standardizzati per ogni tipo di tumore ha un evidente limite concettuale: non tiene conto del fatto, oramai ampiamente dimostrato da centinaia di lavori pubblicati in letteratura, che **ogni tumore è diverso dall'altro** dal punto di vista molecolare, essendo causato (e quindi recando) una combinazione pressoché unica di alterazioni genetiche.

Quindi, se vogliamo contrastare con efficacia un tumore dobbiamo colpire uno o più target molecolari in combinazioni differenti e, di conseguenza, non possiamo pretendere di farlo sempre con lo stesso agente terapeutico. Ciò nonostante, si è cercato nel tempo di mettere a punto diverse **combinazioni di farmaci** (cocktail) le quali hanno mostrato, sempre in studi clinici in cui i vari tipi di tumore venivano stratificati, efficacia differente a seconda della sotto-stratificazione.

Questo approccio empirico può essere visto come una forma primitiva di terapia mirata, dal momento che le sotto-stratificazioni riflettono in definitiva un assetto molecolare specifico e quindi la terapia viene effettuata sulla base di un assetto genetico ancor prima che sulla base del tessuto d'origine del tumore. Infatti una delle sfide nello sviluppo dei nuovi test molecolari basati sulla firma genetica è proprio quella di classificare i tumori non più sulla base dell'organo o del tessuto di provenienza, ma sulla base del **pathway biochimico alterato**, informazione molto più utile ai fini di una terapia mirata su un target molecolare. Già oggi questo comincia ad essere realizzato quando ad esempio vengono stratificati i tumori della mammella in ER positivi ed ER negativi, e sulla base di questa classificazione vengono pianificate terapie differenti. Il motivo per cui ciò non viene fatto per tutti i tipi di tumore è che fino ad oggi non si disponeva di un sistema per misurare in un modo semplice quantitativo e su larga scala quale pathway biochimico fosse alterato per cui per diversi tipi di tumore si ignora completamente quale sia la serie di eventi genetici che guidano la trasformazione cellulare. Oggi, proprio grazie allo studio della firma genetica, è possibile analizzare i pattern di espressione genica: è quindi **disponibile uno strumento** che consentirà di superare l'ostacolo e sviluppare test predittivi di nuova generazione, basati appunto sui profili di espressione genica.

Ad esempio è stato già dimostrato che in linee cellulari opportunamente manipolate per esprimere il fenotipo tumorale è possibile ottenere delle firme genetiche specifiche per le vie biochimiche governate dall'oncogene RAS, dall'oncogene MYC ecc. Approcci integrati sono allo studio: ad esempio è stato dimostrato che è possibile selezionare utilizzando le classiche tecniche immunoistochimiche tumori della mammella che esprimono l'oncosoppressore PTEN a bassi livelli e correlare questo fenotipo "PTEN-low" ad uno specifico pattern di espressione genica: questi studi hanno dimostrato che la firma genetica basata sullo studio dei pattern di espressione genica è molto più sensibile rispetto alle tecniche immunoistochimiche dal momento che sono in grado di individuare anche quei tumori in cui è alterato il pattern di PTEN ma nei quali il livello della proteina PTEN non è così basso da essere classificato come PTEN-low con l'immunoistochimica.

Lo sviluppo di nuovi biomarcatori predittivi è un iter medico-scientifico estremamente laborioso ed a volte frustrante: i marcatori basati sulla conoscenza spesso risultano inutilizzabili per il semplice fatto che le conoscenze sono ancora poche rispetto alla complessa serie di eventi che governa l'insorgenza e lo sviluppo di un tumore, un processo biologico in cui sono coinvolte centinaia o migliaia di variabili. D'altro canto, l'approccio di "forza bruta" rappresentato dallo sviluppo delle firme genetiche (o studio dei pattern di espressione genica) si sta rivelando molto promettente, dal momento che bypassa completamente alcuni passaggi concettuali e si concentra sul fotografare quello che accade in un dato momento nel tessuto tumorale. L'incontro di questi due approcci offre oggi prospettive di grande interesse nello sviluppo di marcatori predittivi efficaci per mettere in atto terapie mirate tumore-specifiche e paziente-specifiche. Ad oggi sono disponibili (negli Stati Uniti) due pannelli di espressione genica per il tumore della mammella: uno di 16 geni (Oncotype DX, Genomic Health), l'altro di 70 geni (MammaPrint, Agendia); altri pannelli sono allo studio. Si tratta dei primi esempi di **farmacogenomica**, cioè di pianificazione di strategie terapeutiche basate sul genotipo espresso dal tumore.

Costi e benefici. L'uso di un approccio che studia nel contempo diverse alterazioni genetiche è senz'altro più informativo rispetto allo studio di singole molecole e singole alterazioni: per questi motivi sia la comunità scientifica che le autorità internazionali, come

ad esempio l'FDA, guardano con grande interesse agli sviluppi di queste tecnologie, che, però, restano ancora scarsamente utilizzate. Ciò è dovuto principalmente al fatto che la tecnologia dei microarray è relativamente giovane, poco conosciuta in ambito clinico e perfettibile anche dal punto di vista della ripetibilità dei risultati e della strumentazione che deve ancora raggiungere livelli di diffusibilità commerciale sul territorio. Inoltre, gli studi di validazione dei profili di espressione genica sono ad oggi in gran parte retrospettivi (e quindi non particolarmente graditi alla comunità medica, che preferisce basarsi su studi prospettici).

Per alcuni pattern di espressione genica sono ad oggi in corso studi prospettici di una certa portata: lo studio TAILORx per la validazione dell'Oncotype DX e lo studio MINDCAT per la validazione del MammaPrint, ma i primi risultati dovrebbero arrivare solo nel 2010. Nel frattempo sarebbe già importante stabilire dei criteri e delle linee guida per lo sviluppo di questi nuovi test e sui criteri per la loro validazione, cosa che l'FDA ha fatto, ma non altrettanto si può dire, ad oggi per l'EMA (l'Agenzia Europea per i farmaci).

Il crescente interesse dell'FDA per questi nuovi test è indice dell'effettivo interesse nei confronti di una nuova tecnologia che potenzialmente in grado di portare grandi benefici in campo oncologico, oltre che un risparmio per la spesa sanitaria. I benefici sono stati già chiariti in termini di possibilità di pianificare strategie terapeutiche mirate che minimizzano gli effetti avversi ed ottimizzano i risultati. Inoltre la firma genetica garantisce benefici anche dal punto di vista squisitamente tecnico: ampi studi hanno infatti evidenziato che la variabilità inter-laboratorio nella determinazione con tecniche immunoistochimiche dello status del recettore degli estrogeni in tumori della mammella è molto ampia, con una percentuale di falsi negativi che va dal 30 al 60%, mentre le percentuali di concordanza inter-laboratorio negli studi sui microarray sono estremamente elevate. Per quanto riguarda la spesa sanitaria, queste tecniche sono senz'altro molto meno economiche rispetto allo studio dei classici marcatori tumorali. Tuttavia, consentono di risparmiare in termini di terapie non efficaci (e quindi di ospedalizzazioni, nuovi trattamenti, recidive ecc): assicurando quindi benefici sia in termini di salute pubblica che di spesa sanitaria.

::Bibliografia::

- 1.Sawyers C.L. The cancer biomarker problem. Nature 2008; 452:548-552
- 2.Chin L. and Gray J.W. Translating insight from the cancer genome into clinical practice. Nature 2008; 452:553-563
- 3.van 't Veer L. and Bernardis R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. Nature 2008; 452:563-570