



UNIVERSITÀ DI PISA

# Processo di Cancerogenesi

**Tecnologie per la medicina rigenerativa**  
**Ingegneria Biomedica Magistrale**  
**a.a. 2018/2019**



**Giuseppe Novellis**  
**Federica Pennetta**  
**Chiara Bianchi**  
**Florianna Conte**  
**Silvia Chinetti**  
**Martina Vevoto**

# DIAMO UNA DEFINIZIONE

Un tumore o una neoplasia indica ***“una massa di tessuto che cresce in eccesso ed in modo scoordinato rispetto ai tessuti normali, e che, persiste in questo stato dopo la cessazione degli stimoli che hanno indotto il processo”***, questa è la definizione coniata dall'oncologo Rupert Allan Willis, accettata a livello internazionale.

Il termine tumore (tumor, ***“rigonfiamento”***) è usato più per l'aspetto macroscopico che ne è alla base ovvero la formazione di una massa rilevante su un sito anatomico.

Il termine neoplasia, invece, prende in considerazione il contenuto cellulare ed indica una ***“nuova formazione”*** di cellule, quindi ci troviamo ad un livello microscopico.



# FATTORI DI RISCHIO

Non esiste quasi mai, tranne in alcune rare forme ereditarie, un'unica causa che possa spiegare l'insorgenza di un tumore. Al suo sviluppo concorrono diversi fattori, alcuni dei quali non sono modificabili, come i geni ereditati dai propri genitori o l'età, mentre su altri si può intervenire per ridurre il rischio di andare incontro alla malattia.

- ❖ **Età:** l'invecchiamento è il più importante fattore di rischio per il cancro; solitamente i tumori si sviluppano in tarda età (per i tempi di incubazione) ma si possono presentare, con frequenza variabile, a qualunque età.
- ❖ **Fattori ereditari** o più correttamente si dovrebbe parlare di **“familiarità”** ovvero con i geni non si trasmette la malattia ma solo una maggiore predisposizione a svilupparla.
- ❖ **Fattori ambientali:**
  - Inquinamento atmosferico: aumento della mortalità, sia per cause naturali che per cancro, anche quando i livelli di polveri fini sono sotto il limite massimo consentito dalla legge (The Lancet, marzo 2014)
  - Agenti chimici: diossine, pesticidi, idrocarburi
  - Agenti fisici: dosi elevate di radiazioni ionizzanti e l'esposizione a raggi X, radon
  - Agenti infettivi: il cancro non è una malattia contagiosa, né è provocata direttamente da virus o batteri; esistono però alcune infezioni che aumentano la probabilità di ammalarsi (es. epatite)

# FATTORI DI RISCHIO

## ❖ Stili di vita:

- Fumo
- Sole e raggi ultravioletti
- Alcol
- Tipo di alimentazione
- Sovrappeso e obesità
- Sedentarietà

E' vero che il cancro ha molte cause che in ogni persona concorrono tra loro, insieme ad altrettanti fattori, al rischio di ammalarsi. E' vero anche che la maggior parte di questi fattori sono modificabili: quasi un terzo delle morti per cancro si potrebbero evitare solo abolendo l'uso di prodotti a base di tabacco e con una dieta equilibrata accompagnata da una regolare attività fisica.

Diamo qualche numero...

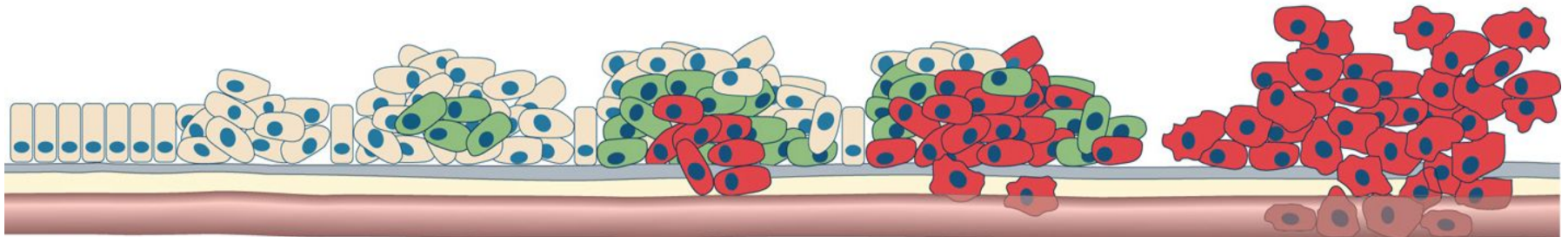


# LIVELLO FISIOLOGICO

Tutti i tumori hanno origine da una cellula. Nei tessuti sani le cellule si riproducono dividendosi, in modo da sopperire alle varie necessità dell'organismo: far crescere l'organismo intero o una sua parte, oppure rimpiazzare le cellule morte o danneggiate, ma fermandosi quando l'esigenza di crescita, riparazione o sostituzione è cessata.

Nei tumori questo delicato equilibrio di oncogenesi, governato dai messaggi chimici inviati da una cellula all'altra e dai geni che si trovano nel DNA, è compromesso. La cellula continua a riprodursi senza freni e vengono meno anche i processi con cui le cellule danneggiate vanno incontro a una morte programmata, detta *apoptosi*.

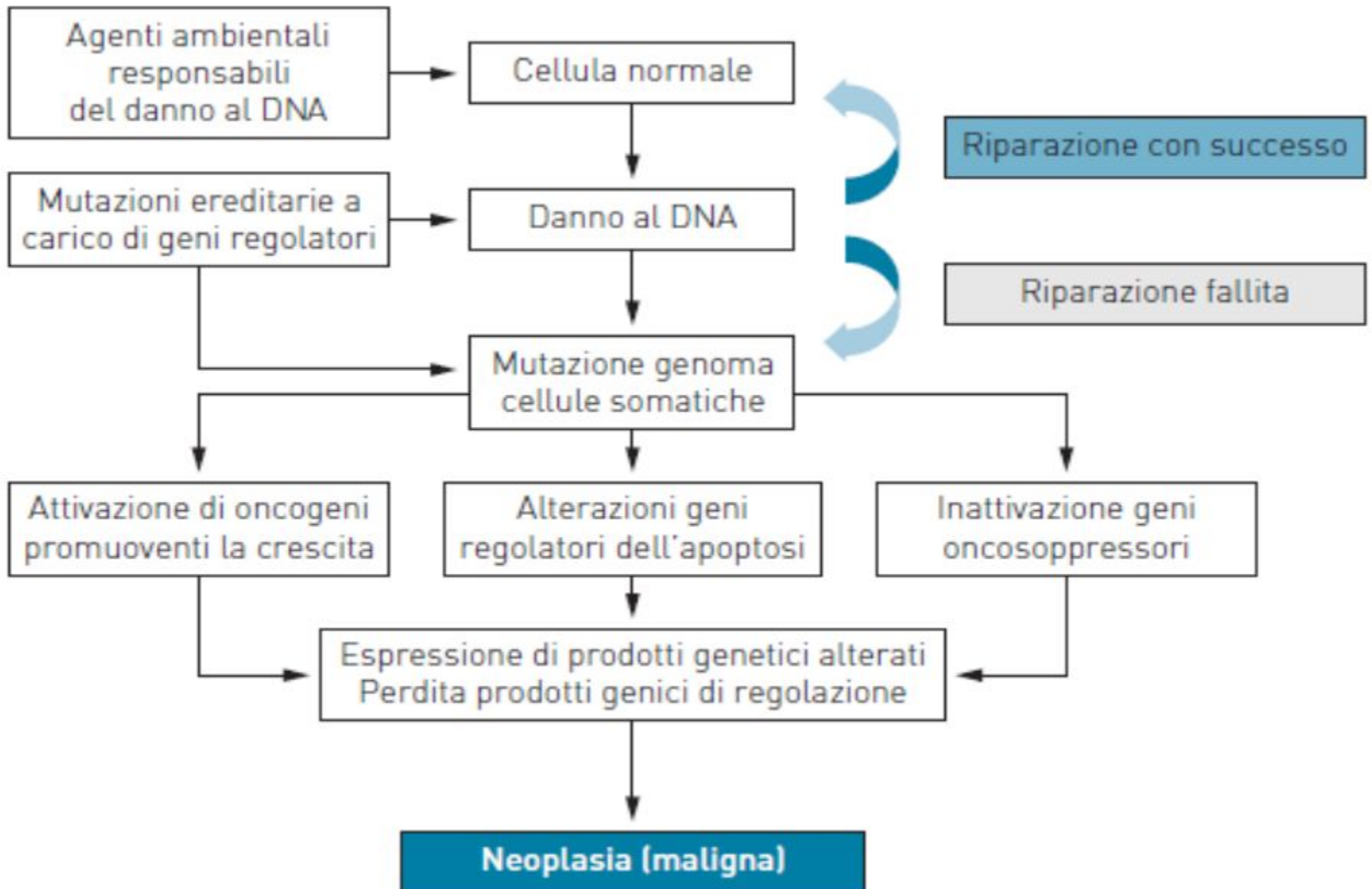
Non basta che sia difettoso un solo meccanismo, ma occorre che più errori si accumulino perché il tumore possa cominciare a svilupparsi. Si parla di mutazioni che, sommandosi l'una all'altra, fanno saltare i meccanismi di controllo.



...dal tessuto sano alla massa tumorale...



# VIE DELLA CANCEROGENESI



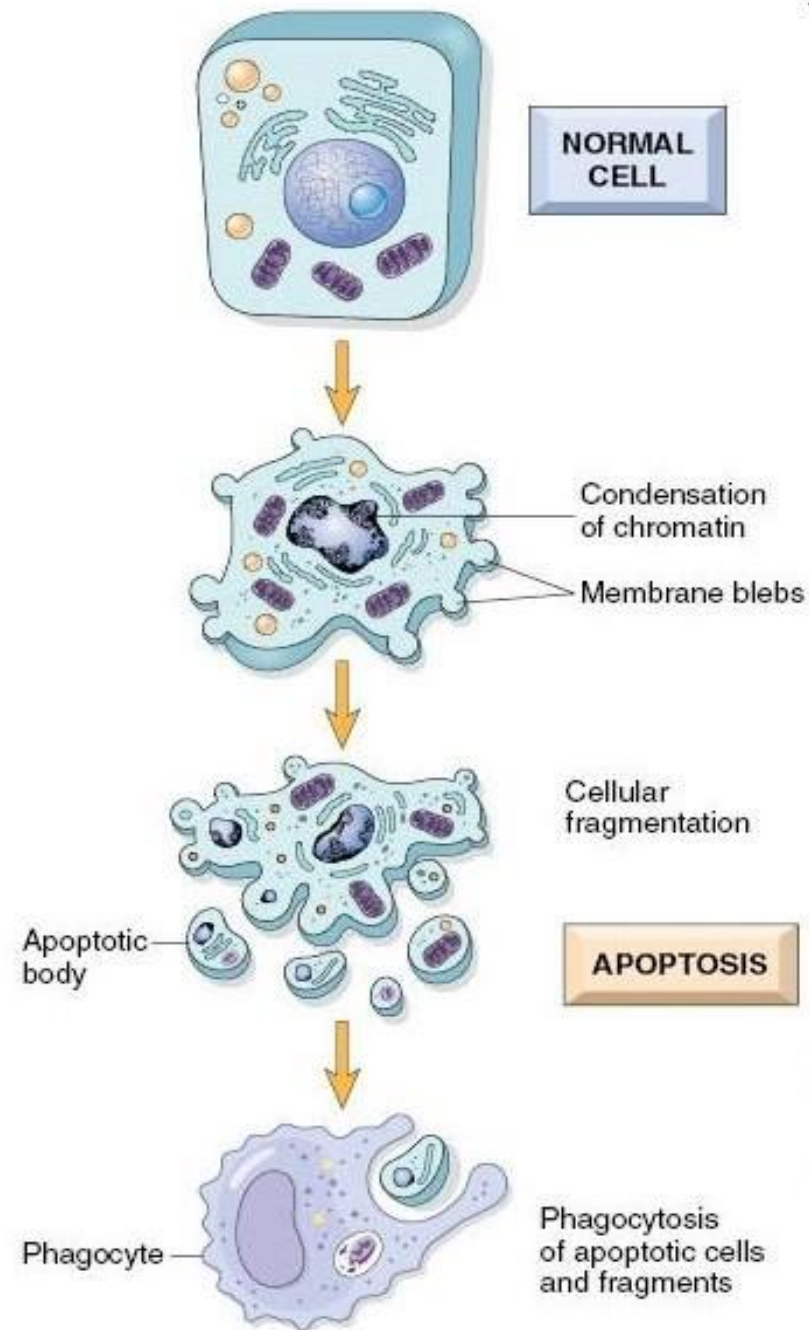
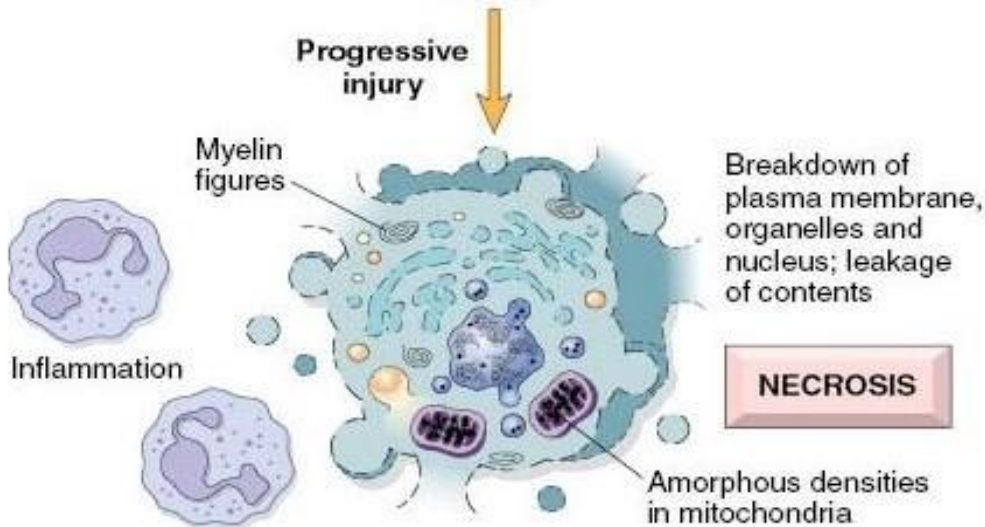
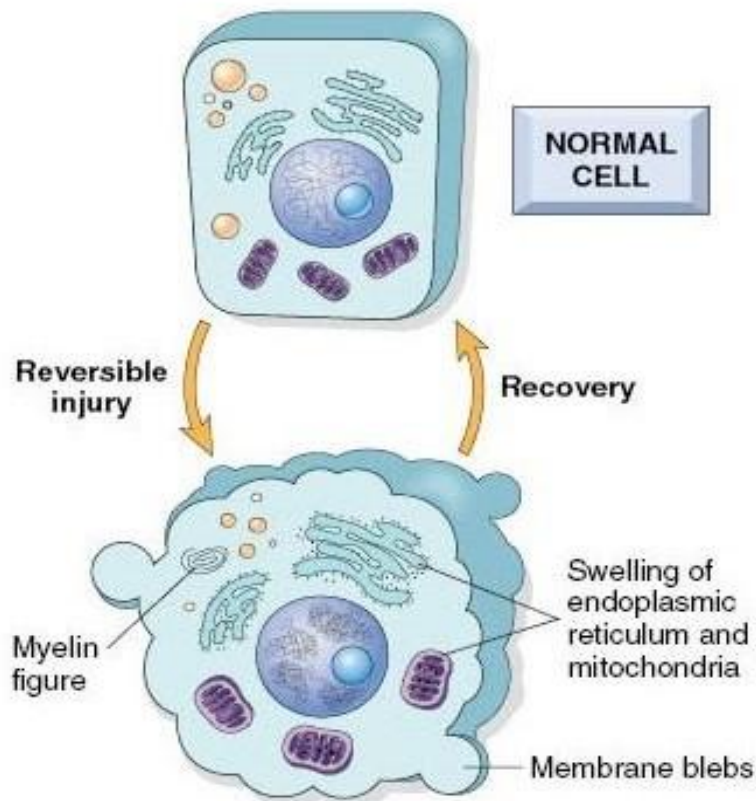
# APOPTOSI

Al contrario della *necrosi*, che è una forma di morte cellulare derivante da un forte stress o trauma cellulare, l'***apoptosi*** è un processo che in condizioni normali contribuisce al mantenimento del numero di cellule di un sistema, in modo ordinato e regolato, che richiede energia (ATP) e generalmente porta ad un vantaggio durante il ciclo vitale dell'organismo (è chiamata anche “morte altruista” o “morte pulita”).

Ad esempio, durante il suo sviluppo l'embrione umano presenta gli abbozzi di mani e piedi “palmati” affinché le dita si differenzino e sarà poi successivamente necessario che le cellule delle membrane interdigitali muoiano.

Dai primi anni '90 la ricerca sull'apoptosi ha acquisito un enorme valore a livello medico: difettosi processi di apoptosi riguardano numerose malattie.

- un'eccessiva attività apoptotica può causare disordini da perdita di cellule, è il caso di molte malattie neurodegenerative, come la malattia di Parkinson
- un'apoptosi carente può implicare una crescita cellulare incontrollata, meccanismo alla base delle neoplasie.





# APOPTOSI

L'attivazione e la regolazione del processo apoptotico possono essere scatenate da due vie:

- ❖ **via estrinseca:** parte da segnali esterni alla cellula; uno di questi è il *fattore di necrosi tumorale* (TNF), un gruppo di proteine prodotte da cellule del sistema immunitario e da macrofagi in presenza di tossine batteriche. Un altro fattore è noto come *ligando di Fas*, stessa famiglia del TNF presente sulla membrana dei linfociti T attivati. Un altro possono essere gli *ormoni steroidei*.
- ❖ **via intrinseca:** parte dai mitocondri e si attiva in risposta alla presenza di anomalie intracellulari (mutazioni o infezioni virali). Qui troviamo una serie di proteine dette “guardiani del genoma”, di cui la più importante e studiata è la p53.

L'atto finale dell'apoptosi è la degradazione e il recupero dei costituenti delle cellule morte, soprattutto proteine e DNA; ciò avviene ad opera dei macrofagi che riconoscono uno specifico segnale di membrana, la presenza di *fosfatidilserina*.

# CASPASI

Le Caspasi sono enzimi proteolitici che, quando sono attivati da speciali molecole guardiane, gli apoptosomi, tagliano proteine strategiche nella cellula.

Il nome C-ASP-ASI (Cisteina ASPartato proteASI) si riferisce a due proprietà di questi enzimi. La prima, sono proteasi alla cisteina, cioè usano l'atomo di zolfo di una cisteina per tagliare le proteine; la seconda sfrutta gli amminoacidi di aspartato. Non tagliano in modo casuale, ma sono progettate per fare solo i tagli necessari per smontare le proteine in modo ordinato.

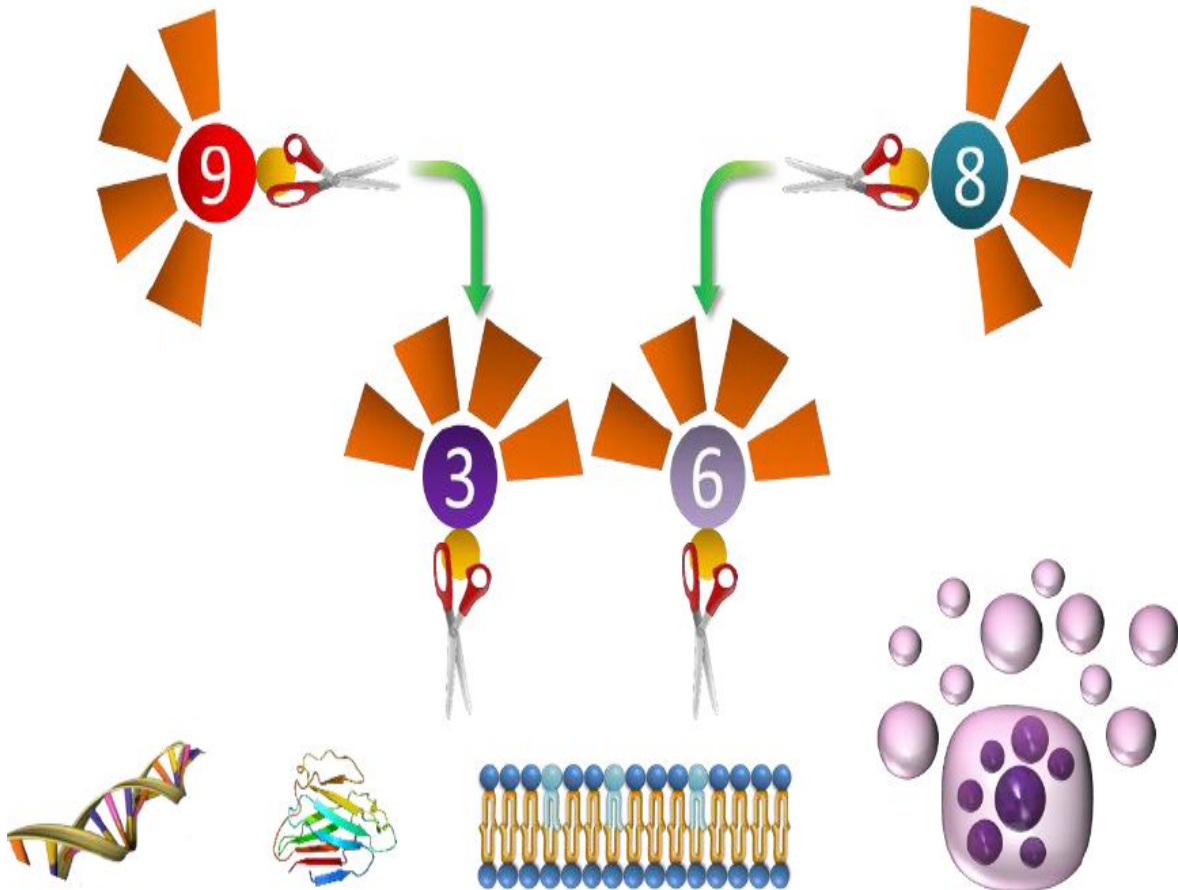
Sono state scoperte almeno una dozzina di caspasi per le cellule umane, ognuno con un compito lievemente diverso.

Nel 1996 fu decisa la nomenclatura delle caspasi, esse furono numerate nell'ordine di scoperta; ad oggi sono state identificate 11 caspasi nei mammiferi.

# CASPASI

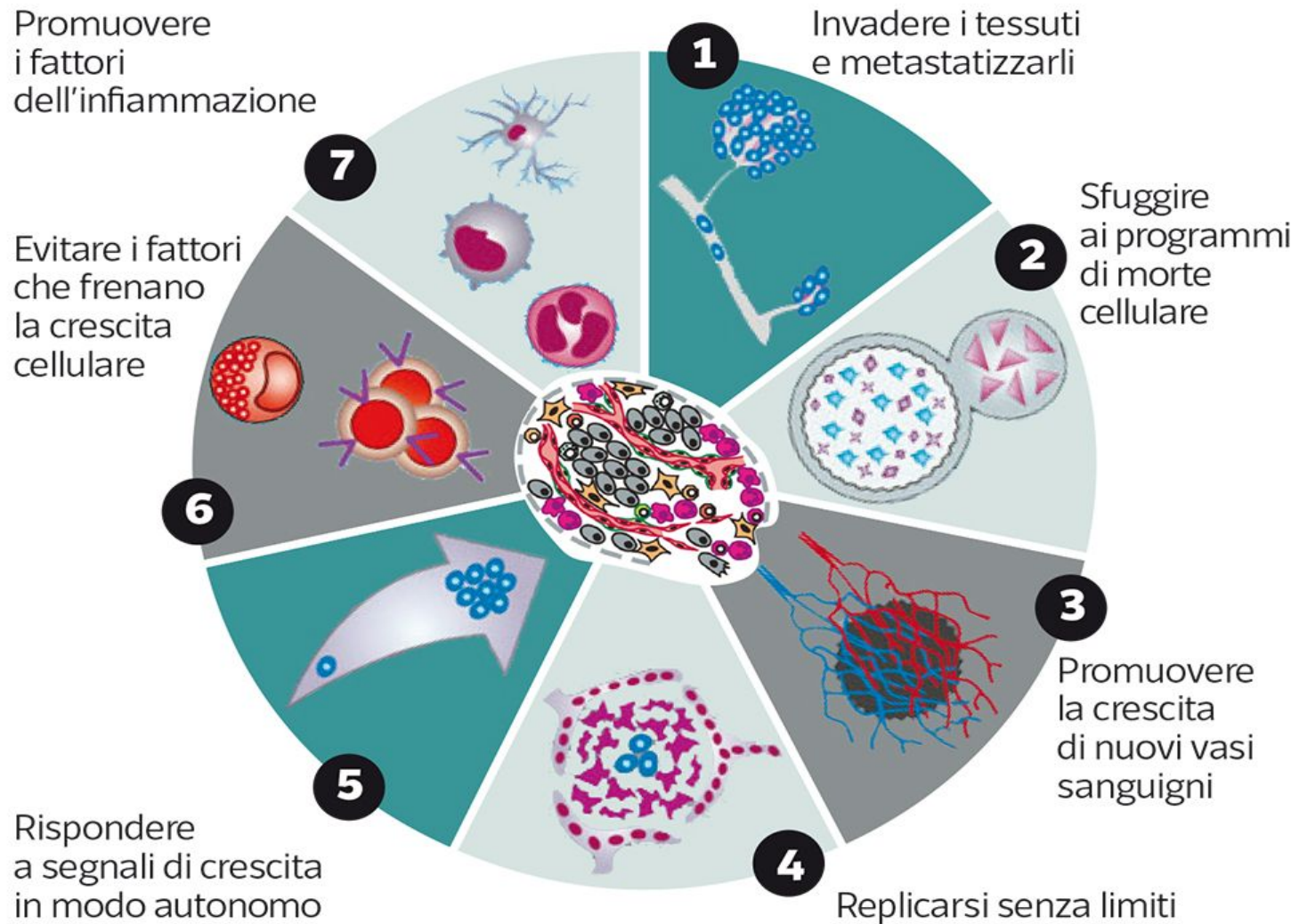
La via intrinseca (9) e la via estrinseca (8) convergono verso un'unica fase effettrice, ciò che cambia è il modo di avviarli. Si attivano le caspasi 3 e 6 innescando numerosi enzimi litici:

- La CA-DNAsi che taglia il DNA in frammenti di 180 bp.
- Numerose proteasi che distruggono le componenti proteiche delle cellule.
- Le flippasi che ribaltano sul lato esterno della membrana i lipidi che richiamano fagociti.
- Complessi enzimatici che frammentano in vescicole il nucleo e il citoplasma (formando gli apoptosomi).



# I sette «pilastri» del cancro

Le cellule neoplastiche sono in grado di sopravvivere grazie a sette «capacità» che le rendono potenzialmente «immortali». Ecco quali sono

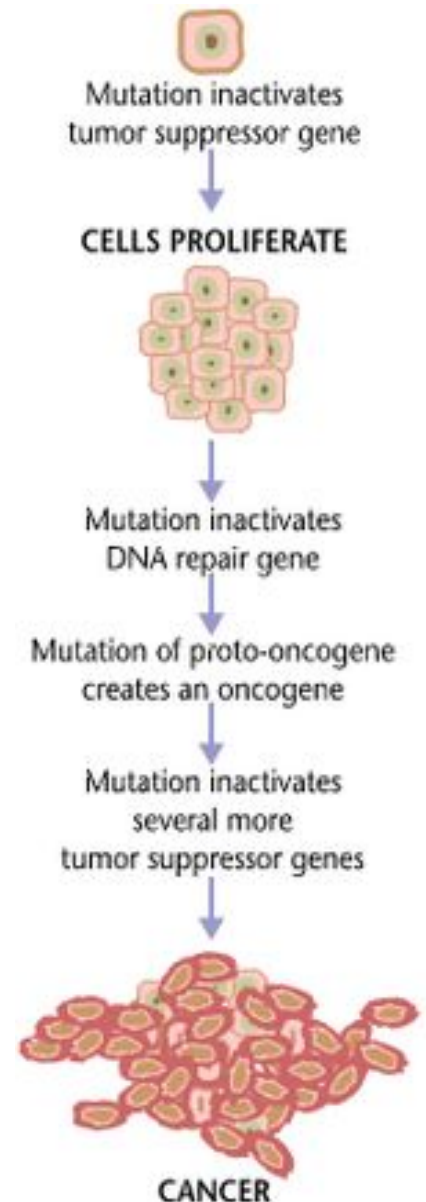


# GRUPPI DI GENI STRETTAMENTE LEGATI ALL'ONCOGENESI

Il cancro è una malattia genetica somatica che colpisce un numero ristretto di geni: gli **oncogeni** e i geni **oncosoppressori**. I primi controllano la crescita cellulare stimolando la cellula a dividersi. I geni oncosoppressori inibiscono la crescita e, se danneggiati, vengono inattivati.

Nelle cellule sane, l'equilibrio fra oncogeni e oncosoppressori porta a un normale tasso di divisione. **L'insorgere del tumore è dovuto a mutazioni che portano l'aumento degli oncogeni o la diminuzione degli oncosoppressori o addirittura entrambi i fenomeni con la trasmissione della mutazione del DNA alle cellule "figlie".** L'effetto finale è uno squilibrio che porta alla replica incontrollata della cellula e all'insorgere della malattia.

In aggiunta abbiamo anche i **geni mutatori**, responsabili dei tumori ereditari.

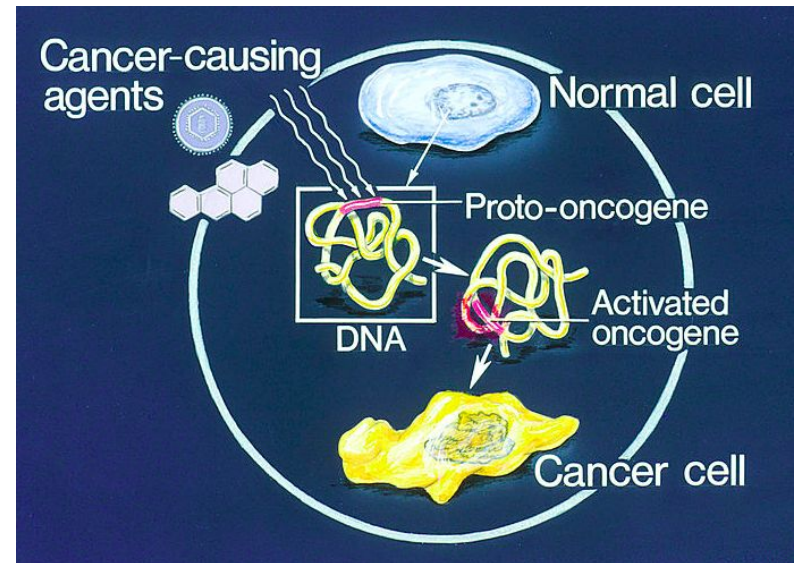




# ONCOGENI

Un **proto-oncogene** è un gene normale che codifica le proteine che regolano il ciclo cellulare, la sopravvivenza e il differenziamento cellulare. Ma quali sono le motivazioni che portano alla trasformazione in oncogeno e allo sviluppo della neoplasia? Sono potenzialmente **oncogeni** tutti i geni che codificano le proteine coinvolte nella trasmissione di uno stimolo proliferativo, a partire dalle molecole-segnale extracellulari dei fattori di crescita.

L'intero processo, in condizioni fisiologiche, è regolato accuratamente da meccanismi a feedback negativo, capaci di interrompere, a ogni stadio, il flusso dei segnali dalla membrana al nucleo. **A differenza dei protooncogeni, gli oncogeni attivati da una mutazione codificano proteine alterate, capaci di innescare la proliferazione, ma insensibili ai meccanismi di retroinibizione che la controllano.**



Ci sono due tipi fondamentali di attivazione:

- Una mutazione dei nucleotidi producono una proteina diversa causando un aumento dell'attività (enzimatica) della proteina, la perdita dei siti di regolazione, la creazione di proteine ibride.
- Un aumento della concentrazione di proteine causata da un aumento dell'espressione genica (attraverso misregolazione), un aumento della stabilità (emivita) della proteina, una duplicazione o amplificazione del gene che codifica per la proteina.

# ONCO-SOPPRESSORI

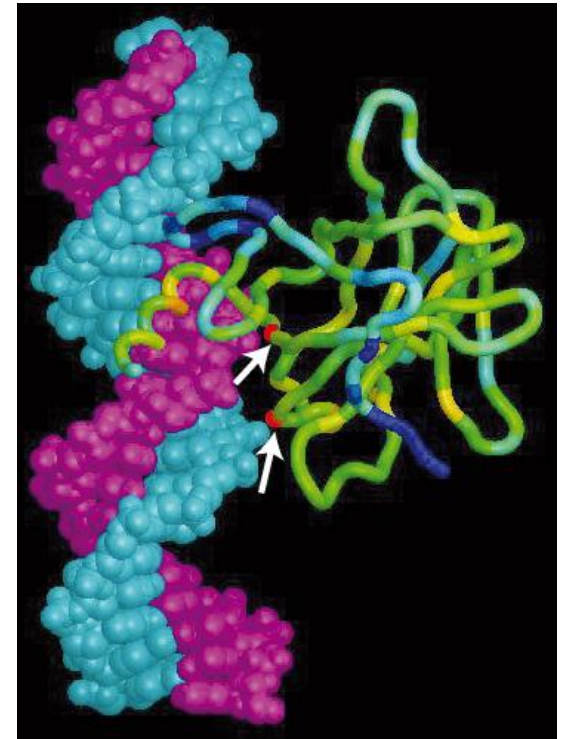
Le proteine codificate dai geni oncosoppressori svolgono le seguenti funzioni:

1. **Repressione di geni essenziali per la prosecuzione del ciclo cellulare,**
2. **Interruzione del ciclo cellulare in caso di DNA danneggiato,**
3. **Avvio dell'apoptosi,**
4. **Soppressione di metastasi.**

Quando gli oncosoppressori sono assenti o inattivati - ad esempio in seguito all'insorgenza di una mutazione - la cellula può progredire verso la trasformazione in cellula cancerosa, solitamente in presenza di altre modificazioni genetiche.

## GENE p53

Ha la **funzione di monitorare l'integrità del DNA** ed è infatti soprannominato “angelo custode del genoma” o “guardiano del genoma”. Quando si imbatte in un danno genetico si attiva come fattore trascrizionale e promuove l'espressione di geni che producono la proteina p21, la quale arresta la divisione della cellula affinché si possano verificare i processi di riparazione prima che il DNA alterato si replichi e sia trasmesso alle cellule figlie; se il danno non viene riparato si verifica la morte per apoptosi. Mutazioni di *p53* fanno sì che la cellula danneggiata possa ugualmente replicarsi e accumulare in tal modo mutazioni che, con il tempo, possono determinare la trasformazione neoplastica della cellula.



# Come usare p53 come bersaglio di terapie mirate o come marcatore della prognosi della malattia?

## Mechanical cues control mutant p53 stability through a mevalonate-RhoA axis

Eleonora Ingallina<sup>1</sup>, Giovanni Sorrentino<sup>1,9</sup>, Rebecca Bertolio<sup>1,2</sup>, Kamil Lisek<sup>1,10</sup>, Alessandro Zannini<sup>1,2</sup>, Luca Azzolin<sup>3</sup>, Luisa Ulloa Severino<sup>2,4</sup>, Denis Scaini<sup>2,4</sup>, Miguel Mano<sup>5,6</sup>, Fiamma Mantovani<sup>1,2</sup>, Antonio Rosato<sup>7</sup>, Silvio Bicciato<sup>8</sup>, Stefano Piccolo<sup>3</sup> and Giannino Del Sal<sup>1,2\*</sup>

**Constatazione:** Attraverso lo screening di centinaia di composti chimici sono state trovate molecole capaci di far scomparire la proteina p53 mutata dalle cellule tumorali. Tra le molecole con gli effetti più promettenti sui complessi di proteine coinvolti nella degradazione della p53 mutata ci sono anche le statine, i farmaci utilizzati contro l'ipercolesterolemia.

**Idea:** La proteina p53 mutata dà origine a un circuito che si auto-rinforza. Infatti, se da un lato i segnali meccanici dell'ambiente tumorale stimolano l'accumulo di p53 mutata, questa a sua volta è in grado di rafforzare la risposta della cellula agli stessi segnali attraverso la riprogrammazione del metabolismo cellulare del colesterolo. Potrebbe essere che p53 e la via di sintesi del colesterolo siano connessi?

**Scoperta:** Le analisi al microscopio a forza atomica hanno permesso di studiare la rigidità delle cellule e dei tessuti tumorali e di mettere in relazione questo parametro con la presenza della proteina p53 mutata e con l'effetto dei farmaci che inibiscono il metabolismo del colesterolo.

**Gli scienziati coordinati da Del Sal hanno dimostrato che, agendo su questo aspetto del metabolismo della cellula tumorale, si riesce a colpire e destabilizzare la p53 mutata, a ristabilire le proprietà meccaniche del tessuto e a fermare il tumore. Ed è possibile farlo con farmaci già noti e in uso per altre malattie, come le statine.**

# GENI MUTATORI - TUMORI EREDITARI

Tali geni sono coinvolti, se mutati, nello sviluppo di una forma ereditaria di carcinoma (il più comune è il tumore del colon). **Questi tumori danno vita a un fenomeno detto “instabilità dei microsatelliti”, dovuto al frequente sistema di riparazione di appaiamento effettuato non correttamente dei nucleotidi nella sequenza di alcuni microsatelliti.**

Le persone con una malattia/sindrome ereditaria di predisposizione al cancro sono a rischio di sviluppare tumori in giovane età, spesso multipli e in diversi distretti corporei. In questi casi la cancerogenesi segue il **modello *two-hits***, per cui la prima mutazione è ereditata mentre la seconda, somatica, disattiva l'altro allele. Viceversa nelle forme tumorali sporadiche entrambe le mutazioni devono avvenire a livello somatico.

Il riconoscimento degli individui con un rischio ereditario di cancro si basa su un'accurata ricostruzione della storia clinica personale e familiare e avviene solitamente nell'ambito di una Consulenza Genetica Oncologica.

Sebbene i tumori ereditari rappresentino solo una piccola frazione di tutti i tumori che oggi affliggono l'umanità (1-10%), le conoscenze di genetica molecolare derivanti dal loro studio hanno cambiato non solo la gestione clinica di questi pazienti e delle loro famiglie, ma hanno fornito importanti informazioni sui processi molecolari coinvolti anche nei corrispondenti, ma ben più numerosi, tumori sporadici.

# ONCOVIRUS

I virus associati a tumori sono caratterizzati dalla capacità di instaurare infezione persistente nell'uomo e non essendo esclusivamente agenti carcinogenetici, lo sviluppo del tumore rappresenta un evento accidentale nel corso della storia naturale dell'infezione.

I virus possono causare tumori con meccanismi diretti, cioè collegati alla presenza di proteine virali ad azione tumorale (oncogeni), oppure con meccanismi indiretti che provocano una iperattività cellulare o la perdita del controllo immunitario favorendo l'insorgenza del tumore.

Virus a DNA:

- ingresso del virus nella cellula tramite un recettore specifico,
- liberazione del genoma dal capsido,
- integrazione del DNA virale col genoma della cellula,
- i geni precoci codificano per le proteine trasformanti (fattori di crescita o proteine che antagonizzano l'azione degli anti-oncogeni).

Virus a RNA:

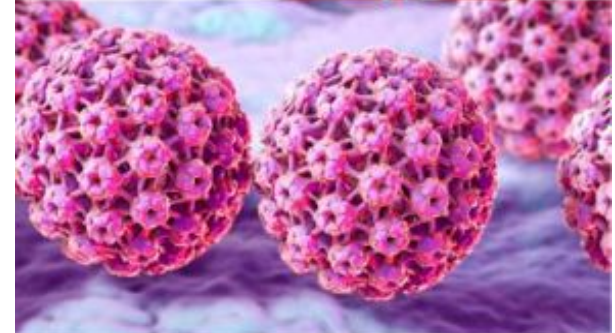
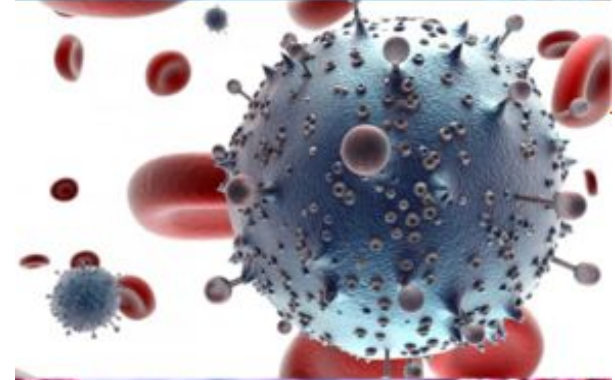
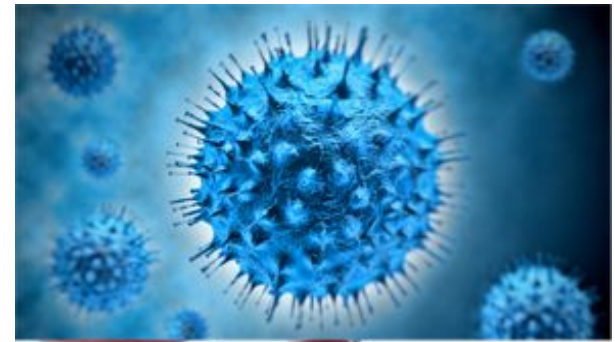
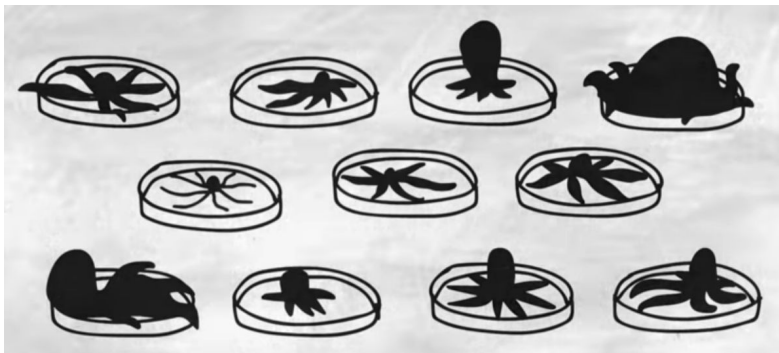
- ingresso del virus nella cellula tramite un recettore specifico,
- liberazione del genoma dal capsido,
- trascrizione inversa dell'RNA virale a DNA a doppia elica,
- integrazione del provirus nel DNA cellulare,
- i geni virali precoci codificano per le proteine trasformanti (fattori di crescita o proteine che antagonizzano l'azione degli anti-oncogeni).



L'identificazione di agenti infettivi come causa di una quota considerevole dei tumori umani, circa il 20%, può essere considerato uno dei maggiori risultati della ricerca sul cancro degli ultimi venti anni. Infatti l'identificazione di nuove sedi anatomiche di cancro attribuite a questi agenti biologici virali porta a un numero sempre maggiore di tumori maligni potenzialmente prevenibile.

Ad esempio (nell'illustrazione a dx i virus nello stesso ordine dell'elenco):

- Il virus di Epstein-Barr (EBV) può dar vita a diversi tipi di tumore, tra cui il carcinoma rinofaringeo. L' EBV nel 5-10% porta a dei carcinomi gastrici.
- Gli individui che sono infettati con HIV-1 hanno un alto rischio di sviluppare un tumore maligno. L'infezione da HIV-1, principalmente attraverso l'immunosoppressione, porta infatti a un aumento di replicazione di virus oncogeni come EBV e KSHV.
- Alcuni ceppi del Papillomavirus umano, classificati come cancerogeni, causano il carcinoma della cervice uterina.
- L'Helicobacter pylori è invece associato in particolare al cancro gastrico, uno dei tumori maligni più diffusi nel mondo.



# VIRUS PER LA LOTTA CONTRO IL CANCRO

Il trattamento convenzionale del cancro può causare effetti collaterali indesiderati a causa della scarsa selettività. Per evitare questi effetti, è importante che le nuove terapie possano rimuovere le cellule tumorali e preservare quelle sane. Uno dei nuovi approcci alla terapia del cancro si basa sullo sviluppo di virus oncolitici, ovvero, virus modificati per infettare solo le cellule tumorali.

Nello studio pubblicato nella rivista Nature Communication, i ricercatori di IDIBAPS e IRB Barcellona hanno sviluppato un approccio innovativo per fornire adenovirus ad alta specificità per malattie virali respiratorie nei confronti delle cellule tumorali.

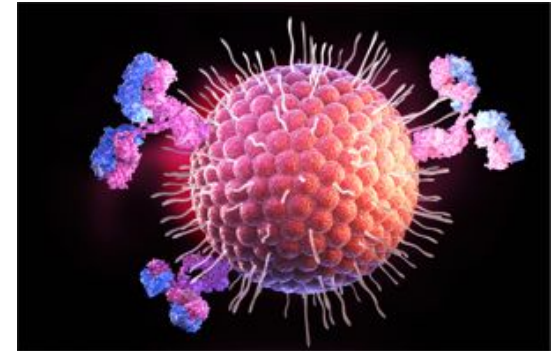


La CPEB è una famiglia di quattro proteine legate al RNA (le molecole che trasportano informazioni dai geni per sintetizzare le proteine) che controllano le espressioni di centinaia di geni e mantengono il funzionamento e la capacità di riparare i tessuti in condizioni normali. Quando i CPEB perdono il loro equilibrio, modificano le espressioni di questi geni nelle cellule e contribuiscono allo sviluppo di processi patologici come il cancro.

I ricercatori spagnoli si sono concentrati sul doppio squilibrio di queste proteine in tessuti sani e nei tumori: da un lato abbiamo CPEB4, che è altamente espresso nelle cellule tumorali ed è necessario per la crescita del tumore. Dall'altra parte abbiamo CPEB1, espresso nel tessuto sano e perso nelle cellule tumorali. Chiave della ricerca è squilibrio che ha permesso di realizzare un virus che va ad attaccare solo le cellule con livelli alti di CPEB4 e bassi di CPEB1. Questo significa che il virus attacca solo le cellule tumorali, ignorando i tessuti sani.

# Preclinical Therapy of Disseminated HER-2<sup>+</sup> Ovarian and Breast Carcinomas with a HER-2-Retargeted Oncolytic Herpesvirus

Patrizia Nanni<sup>1</sup>, Valentina Gatta<sup>1</sup>, Laura Menotti<sup>2</sup>, Carla De Giovanni<sup>1</sup>, Marianna Ianzano<sup>1</sup>, Arianna Palladini<sup>1</sup>, Valentina Grosso<sup>1</sup>, Massimiliano Dall'Ora<sup>1</sup>, Stefania Croci<sup>1</sup>, Giordano Nicoletti<sup>3</sup>, Lorena Landuzzi<sup>3</sup>, Manuela Iezzi<sup>4</sup>, Gabriella Campadelli-Fiume<sup>1\*</sup>, Pier-Luigi Lollini<sup>1</sup>



Un gruppo di ricercatori bolognesi, guidati da Pier Luigi Lollini e Gabriella Campadelli-Fiume, sta lavorando da anni a una terapia innovativa, che a fine 2017 è stata validata in laboratorio: è possibile modificare il virus dell'herpes facendolo diventare un nuovo e valido alleato contro i tumori del seno e dell'ovaio che presentano uno specifico marcatore (HER-2).

Il trattamento è stato testato già all'Istituto della ricerca sul cancro di Londra su 436 persone con melanoma avanzato. Utilizza il virus che causa l'herpes al quale sono stati rimossi due geni, per evitare che infetti le cellule sane. Il 16% dei pazienti sottoposti alla sperimentazione ha registrato una significativa riduzione della dimensione della massa tumorale entro il primo anno e questo miglioramento si è protratto per almeno 6 mesi. Al contrario, solo il 2% dei pazienti non sottoposti a tale trattamento ha registrato un miglioramento equivalente.

Oltre all'Herpes, si utilizzano diversi altri virus, come quello del raffreddore contro il tumore al colon e dell'ovaio (due fra i tumori più comuni) e della polio contro il glioblastoma (pericolosissimo tumore al cervello).

# STADI DELLA CANCEROGENESI:

*TRASFORMAZIONE MALIGNA*



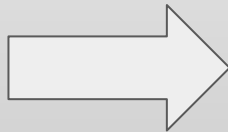
*CRESCITA*



*INVASIONE LOCALE*



*METASTASI*



Il tasso di crescita  
dipende da tre  
fattori fondamentali:

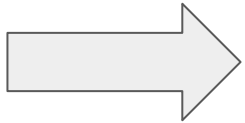
frazione  
di  
crescita

velocità  
del ciclo  
cellulare

neo-angiogenesi

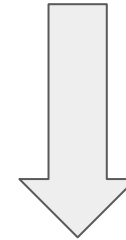
# MICROAMBIENTE TUMORALE

L'idea che il cancro abbia una base genetica risale al 1914 quando, osservando la presenza di anomalie cromosomiche in pazienti affetti da tumori, Theodor Boveri formulò la TEORIA DELLA MUTAZIONE SOMATICA, teoria che non fu presa in considerazione per quasi mezzo secolo, fino a quando tornò alla ribalta grazie alla scoperta del cromosoma Philadelphia (Ph) nella leucemia mieloide cronica (CML).



L'SMT presuppone che i cambiamenti molecolari nel DNA di una cellula progenitrice esplicitamente renderà questa cellula incapace di controllare la sua proliferazione e questo, a sua volta, provocherà la formazione di un tumore.

Nuovi scenari e prospettive si sono aperte con l'elaborazione della più recente "TEORIA DI CAMPO DELL'ORGANIZZAZIONE DEI TESSUTI" (TOFT). Secondo questa teoria il cancro è una patologia dell'intero tessuto e deriva dalla riduzione dei segnali inibitori provenienti dallo stroma.

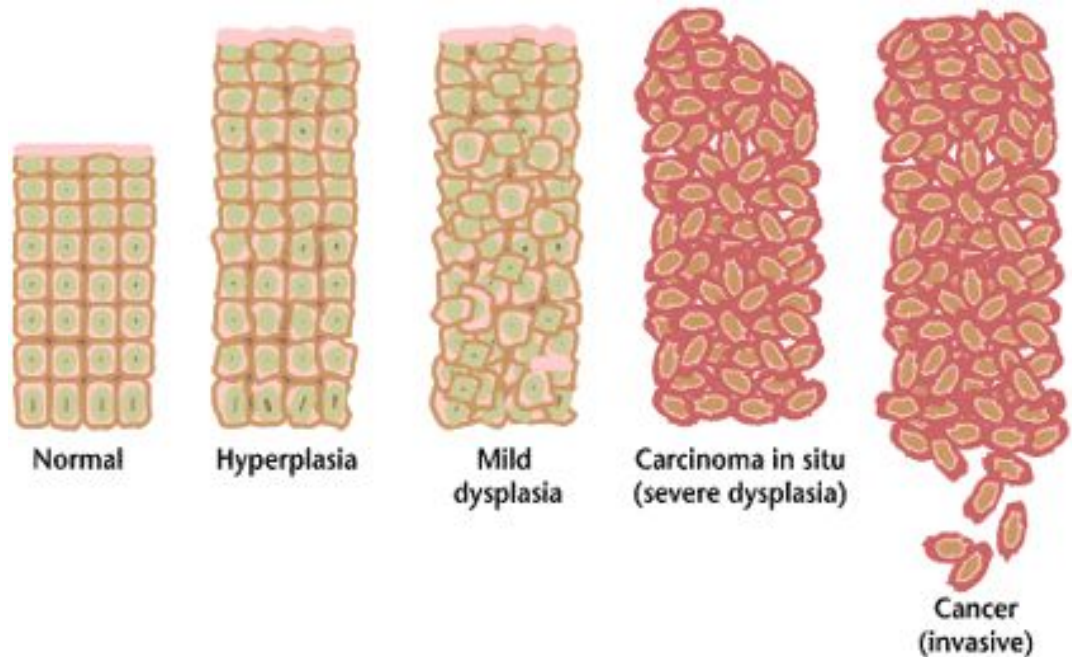


La teoria TOFT (Tissue Organization Field Theory) guarda al cancro come a un fenomeno la cui origine non dipende (causalmente parlando) da nessuna parte molecolare in concreto, ma dalla distruzione dell'organizzazione dinamica che tiene insieme le cellule di un tessuto e quindi anche le parti molecolari che le compongono. La TOFT adotta quindi una prospettiva che è tipicamente sistemica.



# MICROAMBIENTE TUMORALE

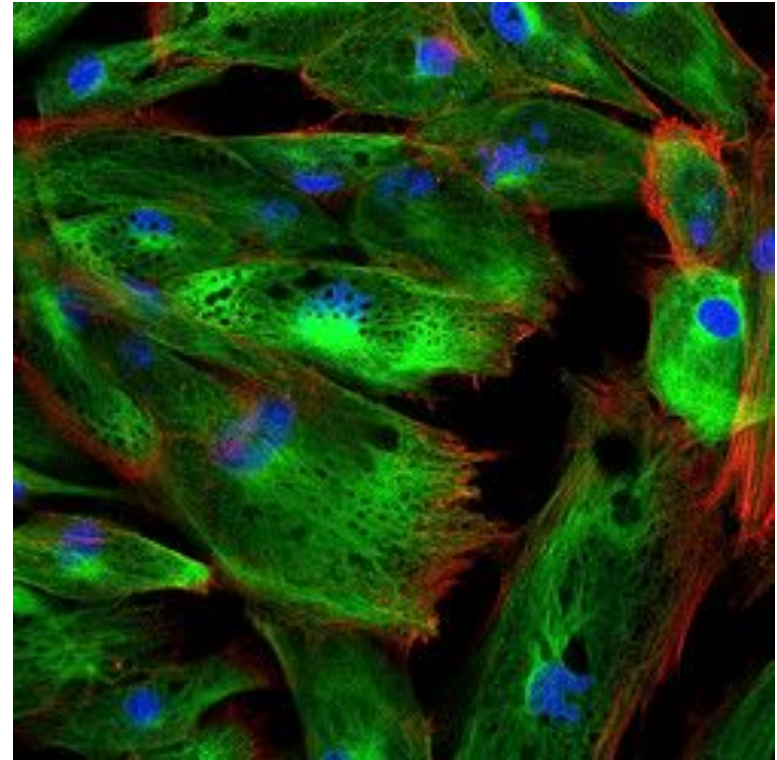
Una delle popolazioni cellulari più abbondanti presenti nel microambiente di tumori solidi sono i *fibroblasti*, che possono contribuire alla crescita ed alla sua diffusione. I fibroblasti rappresentano la componente non vascolare, non epiteliale e non infiammatoria del tessuto connettivo ma ne rappresentano comunque la componente principale. Sono infatti incorporati all'interno della matrice fibrillare del tessuto connettivo e sono, in larga misura, i responsabili della sua sintesi.



C'è molto interesse nel capire le differenze tra uno stroma "normale" ed un stroma tumorale. Si è osservato che lo stroma normale contiene un numero minimo di fibroblasti mentre allo stroma reattivo è associato un aumento del numero di fibroblasti, un aumento della densità capillare e dei depositi di collagene di tipo 1 e di fibrina.

## Ruolo dei fibroblasti nel processo di angiogenesi:

- Il VEGF può essere rilasciato dalle cellule tumorali stesse anche se i fibroblasti e le cellule infiammatorie sono la sua principale fonte di derivazione.
- Il VEGF induce la permeabilità microvascolare che porta allo “stravasamento” di proteine plasmatiche quali la fibrina, che, a sua volta, genera un afflusso di fibroblasti, cellule infiammatorie e cellule endoteliali. Queste cellule producono una ECM ricca di fibronectina e di collagene di tipo I, le quali favoriscono la nascita dell'angiogenesi tumorale.

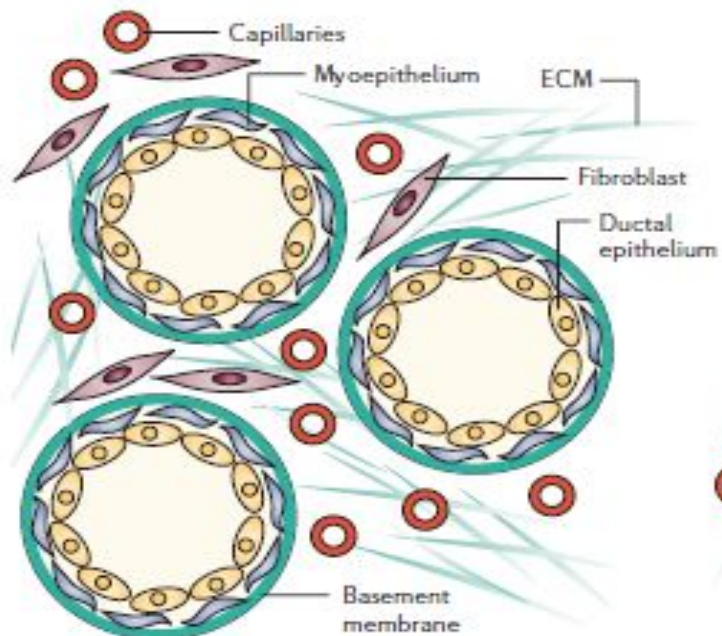


Negli stadi precoci di crescita tumorale, le cellule cancerogene formano una lesione neoplastica che è incorporata nel microambiente di un determinato tessuto (solitamente l'epitelio) ma separata comunque dal tessuto circostante. Questo tipo di lesione neoplastica è chiamato *carcinoma in situ* (CIS) - Per **carcinoma in situ**, detto anche **carcinoma intraepiteliale**, si intende una proliferazione di cellule epiteliali atipiche che presentano vari caratteri morfologici e biologici di malignità, ma non possiedono la capacità infiltrante, ossia la possibilità di invadere i tessuti situati oltre la *membrana basale*, né quindi i vasi sanguigni, né i vasi linfatici.

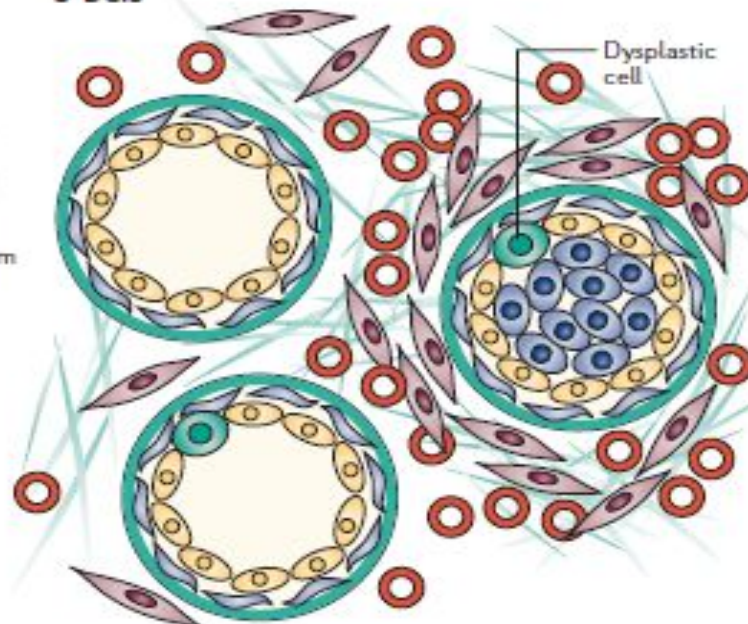
La membrana basale, le cellule del sistema immunitario, i capillari, i fibroblasti e la matrice extracellulare che circonda le cellule cancerogene costituiscono lo stroma tumorale.



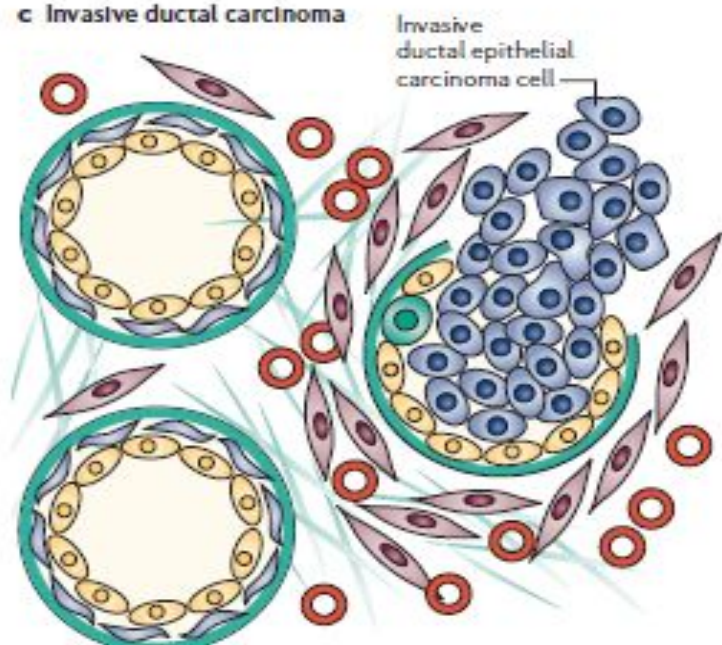
**a Normal breast tissue**



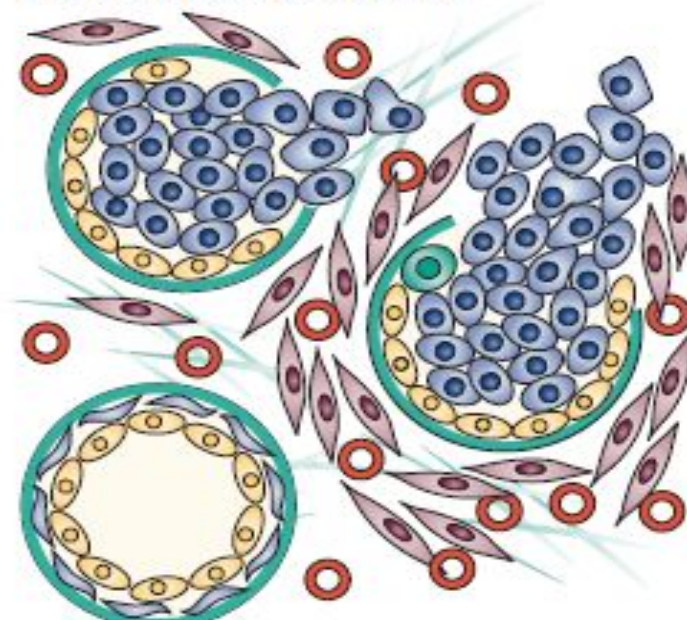
**b DCIS**



**c Invasive ductal carcinoma**

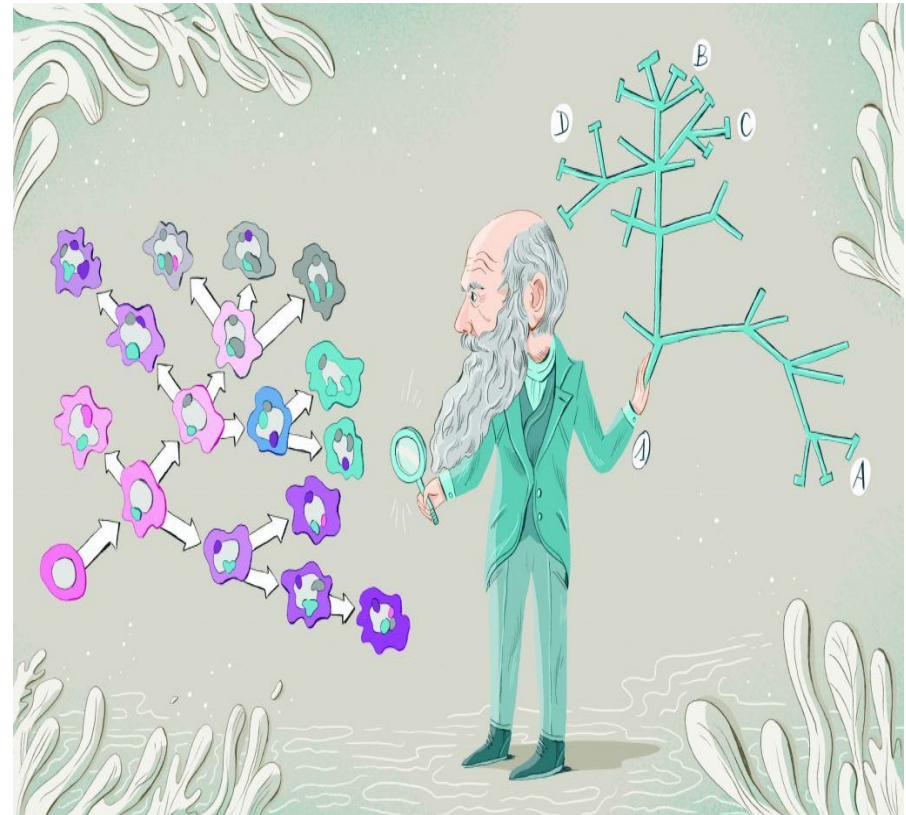


**d Advanced invasive ductal carcinoma**



# MODELLO “DARWINIANO” DELLA CANCEROGENESI

Da diverso tempo si è ipotizzato come la progressione tumorale avvenga attraverso un processo analogo alla evoluzione darwiniana. Le rapide mutazioni che avvengono all'interno del genoma permettono un maggior adattamento al microambiente e consentono di superare le diverse barriere selettive. Il periodo che intercorre tra la nascita dei primi cloni di cellule tumorali e la manifestazione della malattia, riflette il tempo necessario perché le cellule tumorali trovino le condizioni di adattamento al microambiente nel quale si trovano. Pertanto si può evidenziare come le cellule tumorali condizionino il microambiente, il quale, a sua volta, opera una selezione dei cloni più adatti alla sopravvivenza.





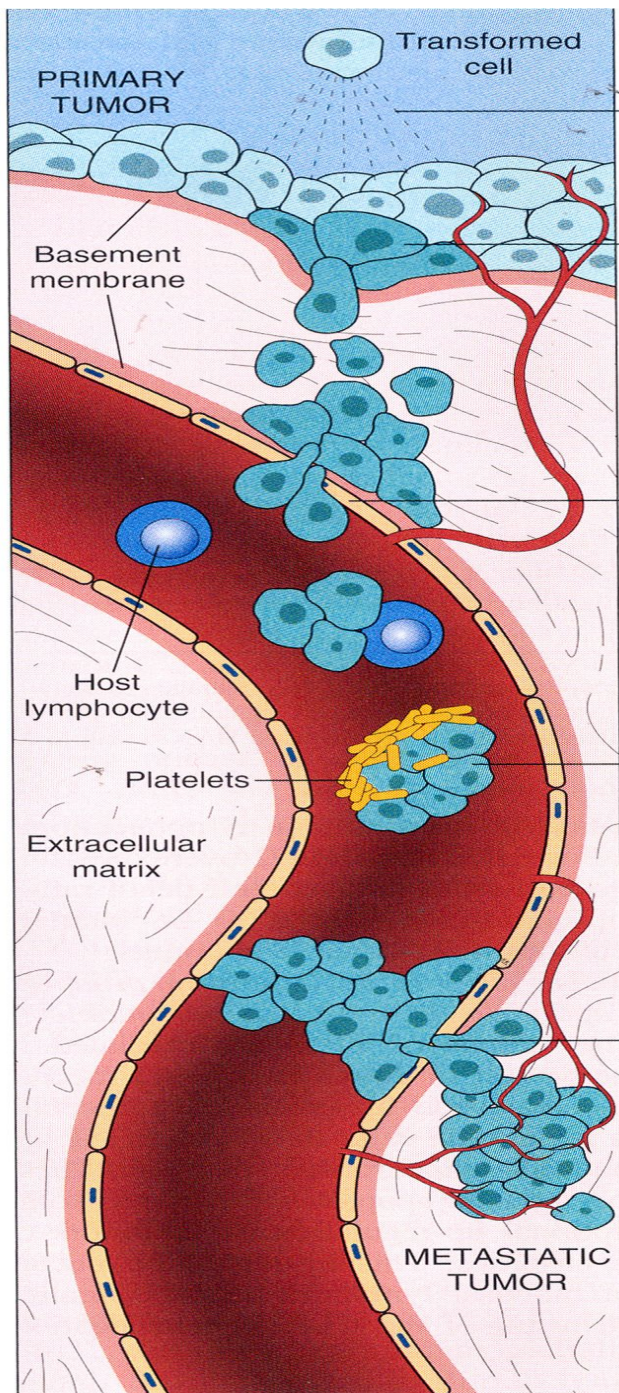
# METASTASI

DEFINIZIONE: *Focolaio neoplastico secondario che trae origine da un focolaio primario e che si sviluppa nell'organismo ospite in un distretto tissutale distante da quello sede della neoplasia primaria.*



Come una singola cellula si libera da un tumore primario e comincia ad invadere il parenchima circostante, si creano dei meccanismi che cominciano a regolare il comportamento. Una volta che una cellula tumorale circolante è sopravvissuta nel torrente circolatorio ed ha aderito all'endotelio di un tessuto bersaglio, essa deve attraversare la barriera endoteliale per colonizzare il tessuto. Le cellule tumorali aderenti vanno incontro a *diapedesi*, un processo mediante il quale gli pseudopodi (estroflessioni mobili di citoplasma) si estendono e penetrano fra le giunzioni cellula-cellula nell'endotelio.





Clonal expansion,  
growth, diversification,  
angiogenesis

Metastatic subclone

Adhesion to and  
invasion of basement  
membrane

Passage through  
extracellular matrix

Intravasation

Interaction with host  
lymphoid cells

Tumor cell  
embolus

Adhesion to  
basement  
membrane

Extravasation

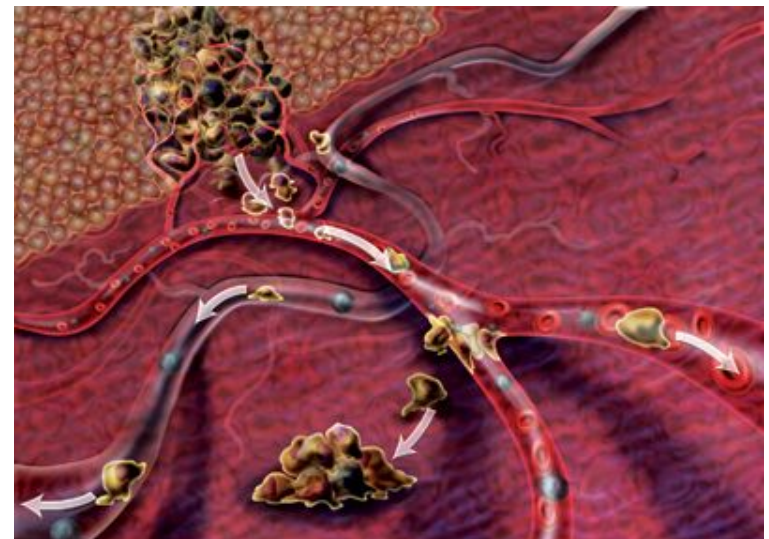
Metastatic  
deposit

Angiogenesis

Growth

La cascata metastatica comprende  
una successione di eventi:

1. invasione della ECM e migrazione;
2. penetrazione dei vasi;
3. circolazione;
4. uscita dai vasi;
5. colonizzazione ed angiogenesi.



# RUOLO DELLA FIBRONECTINA NEI PROCESSI DI DIFFUSIONE METASTATICA

Un studio americano (Vanderbilt University) ha permesso di capire come il tumore riesca a metastatizzare. Si è infatti osservato che le cellule tumorali sono in grado di manipolare i fibroblasti inducendoli a tracciare delle “corsie preferenziali” nella ECM. Perciò le cellule tumorale sfruttano i fibroblasti per creare delle vie di fuga attraverso cui diffondere; questo consente loro di staccarsi dal tumore primitivo, spostarsi rapidamente da un punto all’altro e dare metastasi.

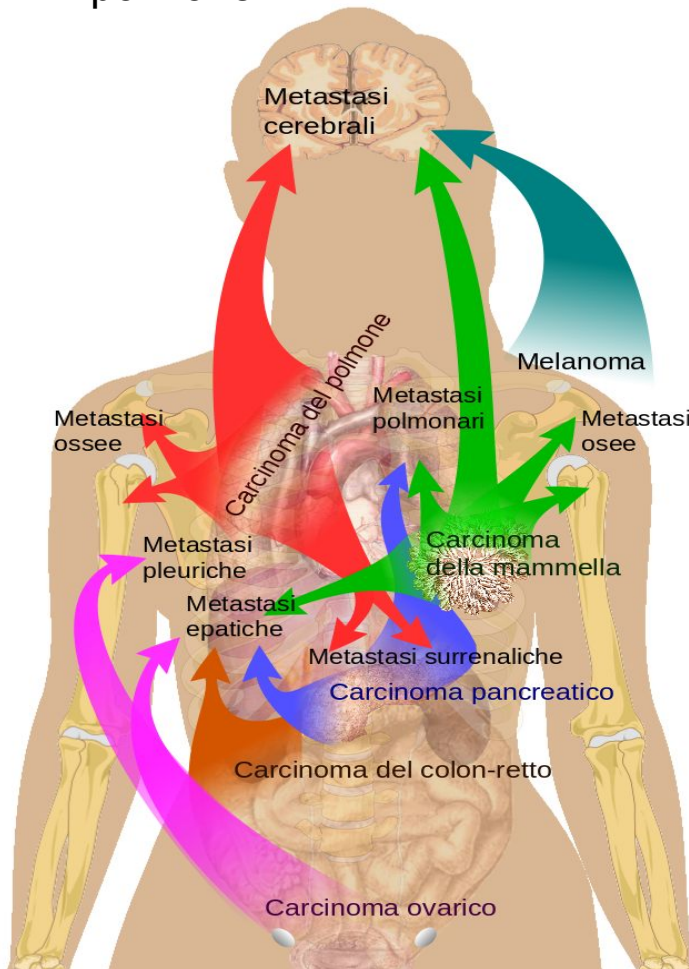
In particolare, sembra che i CAF aprano un vero e proprio varco all’interno della matrice cellulare per consentire alle cellule tumorali di migrare altrove. I fibroblasti “aiutanti” del tumore costruiscono quindi una sorta di “autostrada”, ordinando in file parallele le fibre di fibronectina, prodotta proprio dai fibroblasti “corrotti”. Normalmente, le fibre prodotte dai fibroblasti normali (NAF) si dispongono a “rete” per realizzare una solida impalcatura che sostiene la ECM.

I ricercatori della Vanderbilt hanno prelevato cellule da carcinoma della prostata e da tumori della testa-collo e li hanno posizionati su due piastre, una contenente ECM prodotta dai CAF, l’altra dai NAF. Le cellule tumorali adagiate sulla matrice patologica non hanno avuto difficoltà a migrare in una stessa direzione, questo perché i fibroblasti asserviti al tumore riarrangiano la disposizione della ECM a formare una sorta di canale, grazie al fatto di riuscire ad afferrare con più forza le fibre di fibronectina. A rendere più forti questi fibroblasti è il fatto che la loro proteina motrice, la *miosina II*, è in grado di esercitare una maggiore forza di trazione, agganciandosi alle fibre di fibronectina con degli “uncini” (le integrine). I CAF, rispetto ai NAF, oltre a possedere più ganci di integrina, possiedono anche una GTPasi attivata (RAC) che è fondamentale per il movimento della cellula.



Da un punto di vista generale i siti più comuni dove tendono a diffondersi i tumori sono le aree più vascolarizzate, come:

- ossa
- fegato
- polmone



## **DISTRETTI PIU' COLPITI DALLE METASTASI (linfonodi esclusi):**

- Vescica: ossa, fegato, polmone.
- Seno: ossa, cervello, fegato, polmone.
- Colon e retto: fegato, polmone, peritoneo.
- Rene: ghiandole surrenali, ossa, cervello, fegato.
- Melanoma: ossa, cervello, fegato, polmone, pelle, muscoli.
- Ovaie: fegato, polmone, peritoneo.
- Pancreas: fegato, polmone, peritoneo.
- Prostata: ghiandole surrenali, ossa, fegato, polmone.
- Stomaco: fegato, polmone, peritoneo.
- Tiroide: ossa, fegato, polmone.
- Utero: ossa, fegato, polmone, peritoneo, vagina.

# PREVENZIONE TRAMITE SCREENING

Con la **prevenzione primaria** si cerca di evitare l'insorgenza del cancro, per esempio attraverso interventi sugli stili di vita o sull'ambiente, mentre con la cosiddetta **prevenzione secondaria**, di cui fanno parte gli screening, si mira a individuare la malattia quando è più facilmente curabile.

**Lo screening ha lo scopo di escludere una malattia, mentre gli accertamenti clinici comprendono un insieme di esami al fine di capire la natura di un disturbo.**

Nel soppesare rischi, costi e benefici occorre ricordare che **gli screening si rivolgono a persone nella grande maggioranza sane**. Ciò impone di non eccedere in accertamenti diagnostici invasivi o che comportino costi eccessivi per la collettività.



Molti studi hanno dimostrato che la diagnosi precoce di tumore determina un tempo di sopravvivenza più lungo.

Si avverte quindi la necessità di identificare indicatori biochimici con alta sensibilità ed elevata specificità, che permettano l'identificazione precoce delle neoplasie.

Le alterazioni che caratterizzano la cellula tumorale trovano un loro corrispettivo sia in alterazioni morfologiche sia alterazioni biochimiche, che determinano l'alterata presenza di molecole (marcatori tumorali), che possono essere rilevate sia nei tessuti che nei fluidi dell'organismo.

# MARCATORI TUMORALI

**I marcatori tumorali sono sostanze, solitamente proteine, che vengono sintetizzate dal tessuto neoplastico o dall'organismo in risposta alla crescita neoplastica.** Poiché molte di queste sostanze sono presenti nel sangue, nelle urine e nei tessuti, possono essere utilizzate, insieme ad altri esami e procedure, nella diagnosi di alcuni tipi di cancro così come nella valutazione prognostica e nel monitoraggio di alcuni trattamenti e di eventuali recidive.

Recentemente, la definizione di “marcatore tumorale” è stata ampliata. Sono stati sviluppati nuovi test in grado di ricercare delle variazioni nel materiale genetico (DNA, RNA) oltre che nell’espressione di proteine nei campioni di questi pazienti. Alcune variazioni genetiche sono state associate a certi tipi di cancro e pertanto sono state utilizzate come marcatori tumorali per la diagnosi precoce, per la prognosi e per guidare un trattamento terapeutico mirato. Inoltre, il miglioramento progressivo delle tecnologie esistenti ha permesso anche di valutare non un solo marcatore genetico, ma più marcatori o pannelli di marcatori.

**Quelle molecole, che chiamiamo marcatori tumorali non vengono prodotte solo da tessuti tumorali, ma anche da tessuti normali o colpiti da malattie benigne. La differenza è solo quantitativa, ovvero le cellule tumorali producono e rilasciano quantità maggiori di marcatore rispetto a quelle normali.**

In generale ogni sostanza, misurabile nel sangue o in altri liquidi corporei, correlata alla presenza di un tumore può essere definita "marcatore tumorale". Le concentrazioni dei marcatori tumorali nel sangue dipendono da numerosi fattori:

- dalla capacità delle cellule tumorali di produrre e rilasciare il marcatore;
- dalla produzione di marcatore da parte di organi o tessuti normali o affetti da patologie benigne;
- dalla presenza nel sangue di sostanze interferenti con il sistema di misurazione;
- dalla diluizione del marcatore nei liquidi corporei;
- dalla capacità del fegato e del rene di metabolizzare ed eliminare il marcatore.

Quindi, **i marcatori cosiddetti «tumorali» danno informazioni che sono la somma di numerose variabili fra le quali può essere compreso anche il tumore.**

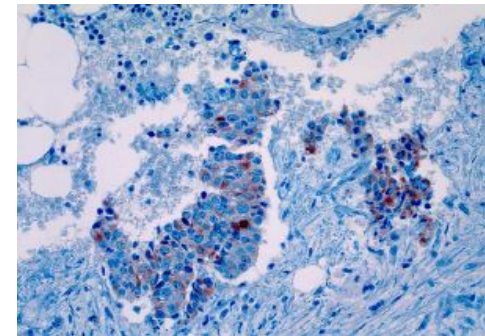


I marcatori oncologici sono sostanze così eterogenee per struttura e funzione che è impossibile classificarli in modo ottimale ed univoco. Esistono, quindi, diverse classificazioni di queste sostanze, a seconda del parametro a cui si fa riferimento:

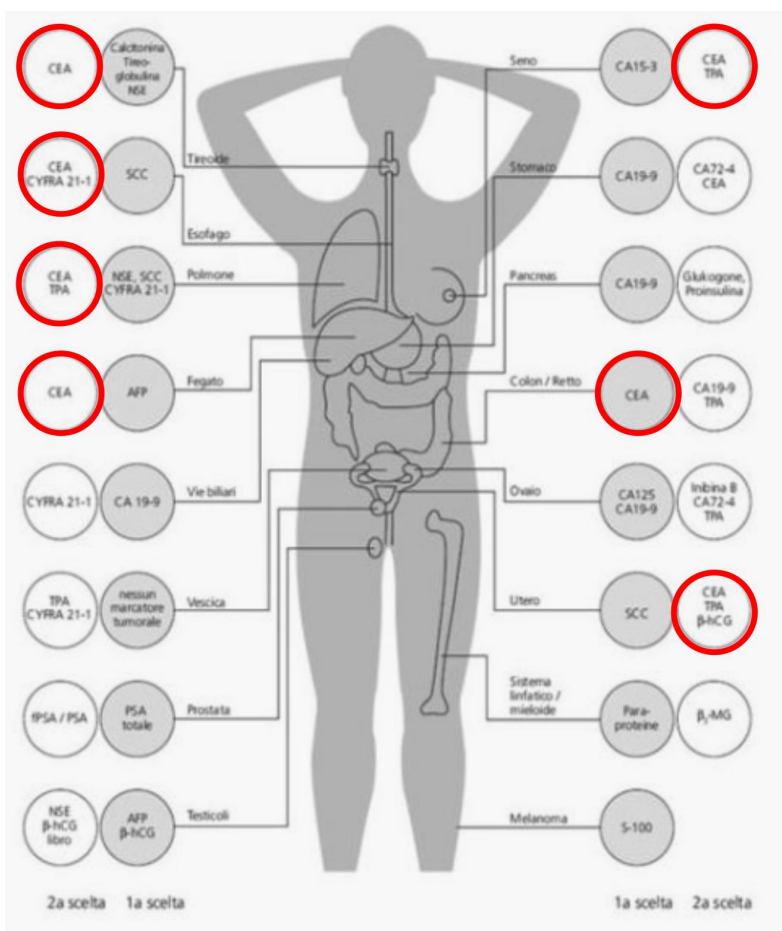
- Criterio topografico (marcatori nucleari, citoplasmatici, di membrana e circolanti)
- Criterio specificità tissutale (specificità d'organo, per tipo cellulare o per caratteristiche istologiche)
- Struttura chimica o funzione biologica

I marcatori vengono misurati con **metodi immunometrici**, cioè la quantità di marcatore presente nel liquido biologico (ad esempio nel sangue) viene misurata con un anticorpo specifico legato ad un sistema di rilevazione (enzimatico, a fluorescenza, ecc). Il legame anticorpo-marcatore determina una reazione la cui intensità è direttamente proporzionale alla quantità del marcatore presente. L'intensità di reazione viene misurata e confrontata con una curva di calibrazione in cui le concentrazioni del marcatore sono note.

Talvolta può succedere che il marcatore presente nel liquido biologico non sia esattamente uguale a quello usato per costruire la curva di calibrazione poiché i marcatori sono molecole complesse, spesso costituiti da famiglie di molecole simili e, quindi, è complesso, se non impossibile, disporre di un marcatore di riferimento (calibratore) esattamente uguale alle sostanze che vogliamo misurare. La conseguenza di tale, per quanto limitata, approssimazione del sistema di misura è che prodotti commerciali diversi utilizzati per misurare uno stesso marcatore possono produrre risultati in parte diversi.



ESAME	VALORE NORMALE	NEOPLASIE ASSOCIATE	CONDIZIONI NON NEOPLASTICHE ASSOCIATE	CAMPIONE BIOLOGICO
CEA (antigene carcino embrionario)	2.5-3 ng/mL nei non fumatori; fino a 5 ng/mL per i fumatori	Tiroide, esofago, polmone, fegato, mammella, colon-retto, utero	Cirrosi, patologie infiammatorie del colon, gastriti, ulcere gastriche, polipi rettali, fumo, artrite, epatite	Sangue



L'antigene carcinoembrionario (CEA) è una glicoproteina prodotta principalmente dalle cellule fetali del tratto digerente, del fegato e del pancreas durante i primi due trimestri di gestazione; mentre nell'adulto piccolissime quantità di CEA vengono secrete dalle cellule del colon, dal parenchima polmonare e dal tessuto mammario durante la lattazione. Il test di valutazione della concentrazione del CEA viene prescritto dal medico quando:

- sospetta che ci possa il paziente possa essere malato di cancro;
- ha bisogno di valutare l'andamento del trattamento chemioterapico di una malattia neoplastica già diagnosticata;
- sospetta che una malattia tumorale sia tornata dopo la fine del trattamento;

L'esame CEA è un test di laboratorio che si esegue su un campione di sangue, prelevato dalla vena di un braccio, nel quale si misura la quantità di questa proteina.

# INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

In linea generale, valori di CEA particolarmente elevati si associano al cancro del colon-retto, ma anche a neoplasie della mammella, dello stomaco, del polmone, del collo dell'utero e dell'ovaio.

## Monitoraggio della terapia e delle recidive dei tumori

- Quando la concentrazione di antigene carcinoembrionario è inizialmente elevata e, successivamente, decresce fino alla normalità dopo la terapia, significa che il tumore è stato trattato con successo.
- Un rialzo costante della concentrazione del CEA è spesso il primo segnale di recidiva della malattia.
- Va considerato, però, che non tutti i tipi di tumore producono l'antigene carcinoembrionario, è possibile avere il cancro con valori normali di antigene carcino-embrionario. Se il tumore non produce CEA, allora il test non è utile nel programma di monitoraggio.

## Prognosi e/o stadiazione della malattia neoplastica

In caso di tumore di limitate dimensioni o allo stadio iniziale, si registrano spesso concentrazioni normali o poco elevate di CEA. Le persone affette da un tumore esteso, a uno stadio avanzato, o da un cancro diffuso all'interno dell'organismo, presentano più comunemente delle concentrazioni di antigene carcino-embrionario elevate.

## Determinazione presenza di metastasi

Se il CEA è presente in un fluido corporeo che non sia il sangue, è probabile che il tumore si sia diffuso in quell'area del corpo. Ad esempio, il riscontro dell'antigene carcinoembionario nel liquido cerebrospinale, può essere segno di metastasi al sistema nervoso centrale.

**Il risultato fornito dal marcatore tumorale dovrà essere valutato insieme alla storia clinica del paziente e ad altri esami, quali diagnostica strumentale, scintigrafia e biopsia.**



# BIOPSIA

Il termine biopsia ha origine greca e deriva dall'unione tra la parola "**bios**" (βίος), che vuol dire "vita", e la parola "**opsis**" (ὄψις), che significa "visione".

Quindi, in base a quanto appena affermato, il significato letterale di biopsia è "**visione della vita**".

La **biopsia** è un **esame medico diagnostico invasivo** che consiste nel prelievo da un organismo vivente di una porzione o di un frammento di tessuto per essere analizzato al microscopio o anche con tecniche di microbiologia o biologia molecolare.

La biopsia viene eseguita al fine di escludere o confermare un sospetto di malattia (ad es. infiammazione o tumore), cioè di arrivare a una diagnosi istopatologica, sulle basi di osservazioni cliniche, radiologiche o strumentali, e quindi di definirne con precisione le caratteristiche (gravità, estensione, possibili terapie).

La **biopsia solida** ha un ruolo molto importante all'interno di una terapia perché lo specialista, basandosi sui risultati di questo esame, indirizza il paziente verso il tipo di trattamento e di cura più idoneo.

La **biopsia liquida** invece, consiste in un prelievo di sangue o di urina che viene poi sottoposto ad analisi molecolari.

L'impiego di un siffatto termine trova spiegazione nel fatto che le analisi di laboratorio consistono nell'osservazione, al microscopio, di un campione di cellule viventi.

Da una biopsia su un tumore emergono due importanti parametri che danno un'idea alquanto precisa della gravità della condizione in atto: la **stadiazione** (o stadio) e il **grado**.

Le biopsie tumorali più diffuse sono quelle svolte per i tumori del seno, per i tumori della pelle (melanoma ecc), per i tumori del tratto gastro-intestinale ecc.



# TIPI DI BIOPSIA DISPONIBILI

Esistono **vari tipi di biopsia**: il ricorso a un tipo di biopsia, piuttosto che a un altro, dipende da dove deve avvenire la raccolta del campione cellulare.

I tipi di biopsia disponibili oggi sono:

- La **biopsia cutanea**, nota anche come **biopsia *punch*** o **escissione *punch*** - La biopsia cutanea è indicata per studiare le caratteristiche delle malattie che interessano la pelle. Per la sua esecuzione, i medici si servono di uno strumento chirurgico particolare, una sorta di bisturi circolare, capace di produrre dei fori sulla pelle e rimuovere l'area anatomica corrispondente alla zona d'applicazione.
- L'**agobiopsia** - L'agobiopsia è un tipo di biopsia che, per la raccolta del campione cellulare, prevede l'uso di un ago di dimensioni variabili; ago che il medico infila a livello sottocutaneo, nell'organo o tessuto da analizzare. Molto spesso, per individuare il punto preciso del prelievo, chi esegue questa tipologia di biopsia si avvale delle immagini in tempo reale risultanti da procedure strumentali, come per esempio un'ecografia, una TAC o una risonanza magnetica.
- La **biopsia endoscopica** - La biopsia endoscopica è un tipo di biopsia a cui i medici ricorrono quando riscontrano nel paziente un qualche problema a livello di un organo o una serie di organi accessibili dall'esterno (esofago, stomaco, intestino, trachea, albero bronchiale, vescica ecc). La procedura prevede l'impiego di un endoscopio, ossia uno strumento di forma tubulare, flessibile e dotato alla stessa estremità di una telecamera e un elemento tagliente per la raccolta del campione. Per prelevare il campione cellulare, chi svolge l'esame infila l'endoscopio attraverso l'apertura esterna o lo conduce nel punto desiderato.

- La **biopsia escissionale** - La biopsia escissionale è un tipo di biopsia che prevede la rimozione di un campione cellulare di grandi dimensioni. I medici ricorrono alla biopsia escissionale quando vogliono analizzare intere strutture anomale, come per esempio noduli al seno, noduli alla tiroide ecc.
- La **biopsia perioperatoria** - La biopsia perioperatoria è quell'esame biotico che ha luogo poco prima di un intervento chirurgico. Il suo scopo è chiarire una volta per tutte come e se è effettivamente il caso di procedere con l'operazione di chirurgia. Chiaramente, le analisi di laboratorio devono essere immediate e i risultati devono essere a disposizione del chirurgo operante nel giro di pochi minuti. Di solito, la biopsia perioperatoria prevede l'impiego dell'anestesia generale.

Il tessuto ottenuto viene inviato in un laboratorio di anatomia patologica dove viene esaminato. Per consentire l'allestimento di preparati osservabili al microscopio, il tessuto viene prima fissato in formalina, quindi incluso in paraffina. Della preparazione possono far parte anche colorazioni o utilizzo di metodiche radio-immunologiche per la evidenziazione di cellule o strutture interne ad esse. Il campione così ottenuto può essere tagliato in fette dello spessore di 2-4 micron e montato su un vetrino portaoggetti. Sarà un medico specialista in anatomia patologica a valutare al microscopio il vetrino e a formulare la diagnosi.



# TRATTAMENTI TUMORALI

Negli anni la medicina ha sviluppato diverse tecniche per poter combattere il tumore, che, a seconda della natura, richiede approcci diversi e, talvolta, tempi di cura differenti.

## CHIRURGIA

La *chirurgia* è l'opzione principale nella maggior parte dei tumori solidi ed isolati.

Utilizzata nei casi di masse benigne o di tumori confinati per tentare di resecare l'intera massa ai linfonodi locali, se quest'ultimi vengono invasi dalla malattia, anch'essi saranno rimossi.

Nei casi, invece, di masse tumorali che non possono essere completamente rimosse senza mettere a rischio la vita del paziente, si effettua una *citoriduzione*; riduzione chirurgica, quanto più estesa possibile, della massa per renderla più suscettibile ai successivi trattamenti, come radioterapia o chemioterapia.

## CHEMIOTERAPIA

Trattamento terapeutico che consiste nella somministrazione di più sostanze chimiche allo scopo di eliminare le cellule tumorali ed impedirne la proliferazione. Tali sostanze sono *citotossiche* andando a colpire indiscriminatamente anche le cellule sane.

La chemioterapia si avvale di vari tipi di farmaci che variano per bersaglio e meccanismo d'azione. Sulla base di questi due criteri si possono classificare tali farmaci chemioterapici nel seguente modo:

- *Agenti Alchilanti.*
- *Agenti Antimetaboliti.*
- *Agenti Antimiotici.*
- *Antibiotici Citotossici.*

Un altro approccio chemioterapico è dato dalla *terapia ormonale*, usata soprattutto per neoplasie che coinvolgono organi e tessuti ad essa sensibile.

In altri casi gli ormoni possono essere usati come vettori per diversi farmaci antitumorali.

# RADIOTERAPIA

Particolare terapia che impiega le radiazioni ionizzanti, ovvero i raggi X.

Facendone un uso congiunto con la chirurgia e la chemioterapia, si riesce a colpire, in maniera quanto più precisa possibile, le cellule tumorali, provocando danni minimi ai tessuti sani.

Chiave della radioterapia è la combinazione delle cosiddette quattro R:

- Riparazione del danno cellulare.
- Riossigenazione del tumore.
- Ridistribuzione nel ciclo di vita della cellula.
- Ripopolazione delle cellule.

Si hanno due modalità per effettuare questo tipo di terapia:

- *Teleterapia* (terapia da lontano): la sorgente delle radiazioni è posizionata all'esterno del corpo.
- *Brachiterapia* (terapia da vicino): la sorgente viene portata in modo temporaneo o permanente a contatto o all'interno della zona tumorale.

# IPERTERMIA

Processo per cedere energia ed elevare la temperatura delle cellule cancerogene portandole tra i 41° e i 44° C allo scopo di danneggiare o distruggere il tumore, producendo minimi effetti sui tessuti sani vicini.

Il trattamento si effettua con apparati a microonde o a radiofrequenza che generano onde elettromagnetiche a potenze e frequenze adeguate al raggiungimento dell'ipertermia del volume del bersaglio.

Le cellule tumorali avendo quasi sempre un'impalcatura vascolare caotica e disorganizzata, non sono in grado di dissipare il calore in eccesso, a differenza di quelle sane. Questa distruzione viene attribuita al danno provocato dalla temperatura alla membrana plasmatica, allo scheletro cellulare e al nucleo cellulare.

Tale trattamento non causa tossicità e usualmente viene combinato con la radioterapia e la chemioterapia che ne sinergizzano l'azione.

## TERAPIA MIRATA

Tipo di terapia farmacologica che, a differenza della chemioterapia che agisce su meccanismi aspecifici legati a caratteristiche proprie di tutte le cellule a rapida proliferazione (comprese quelle normali), interviene sui meccanismi legati all'espressione di *oncogeni* e *geni oncosoppressori*, alla base della specifica azione di promozione tumorale. Quindi, grazie alla conoscenza dei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo, della crescita e della diffusione del tumore, la *terapia mirata* agisce in maniera selettiva su alcuni di questi processi cellulari.

Questo significa che la cura non viene più scelta in base alla sede di proliferazione del tumore, ma anche in relazione alle sue caratteristiche molecolari, riducendo così gli effetti collaterali, senza provocare danni alle cellule sane.

Essa agisce su uno o più fenomeni che favoriscono la crescita e lo sviluppo del cancro. In particolare è in grado di:

- Diminuire la proliferazione delle cellule cancerose.
- Ostacolare l'*angiogenesi*.
- Promuovere l'*apoptosi* delle cellule tumorali.
- Stimolare il sistema immunitario.
- Liberare sostanze tossiche che agiscono sulle cellule tumorali.



## FARMACI BIOLOGICI

Sono una particolare categoria di terapia mirata, chiamati in questo modo perché simulano sostanze presenti nell'organismo.

Comprendono:

- *Fattori di crescita* detti anche *colony stimulating factors (CSF)*: sostanze che, appunto, stimolano la produzione delle cellule ematiche da parte del midollo. Si usano spesso dopo la chemioterapia per ristabilire un numero adeguato di cellule nel sangue.
- *Anticorpi monoclonali*: molecole in grado di riconoscere un bersaglio presente sulle cellule tumorali, ma non su quelle sane. Il loro utilizzo permette, quindi, di indirizzare la cura soltanto contro il tumore, risparmiando il più possibile i tessuti sani.
- *Vaccini*: stimolano il sistema immunitario a riconoscere il tumore come estraneo per poi distruggerlo. Sono ancora in fase di studio quelli preventivi.

Questi farmaci sono la base di quella che è diventata una delle quattro strategie per combattere il tumore, l'*immunoterapia*.

# IMMUNOTERAPIA: NUOVA FRONTIERA PER LA CURA DEL CANCRO

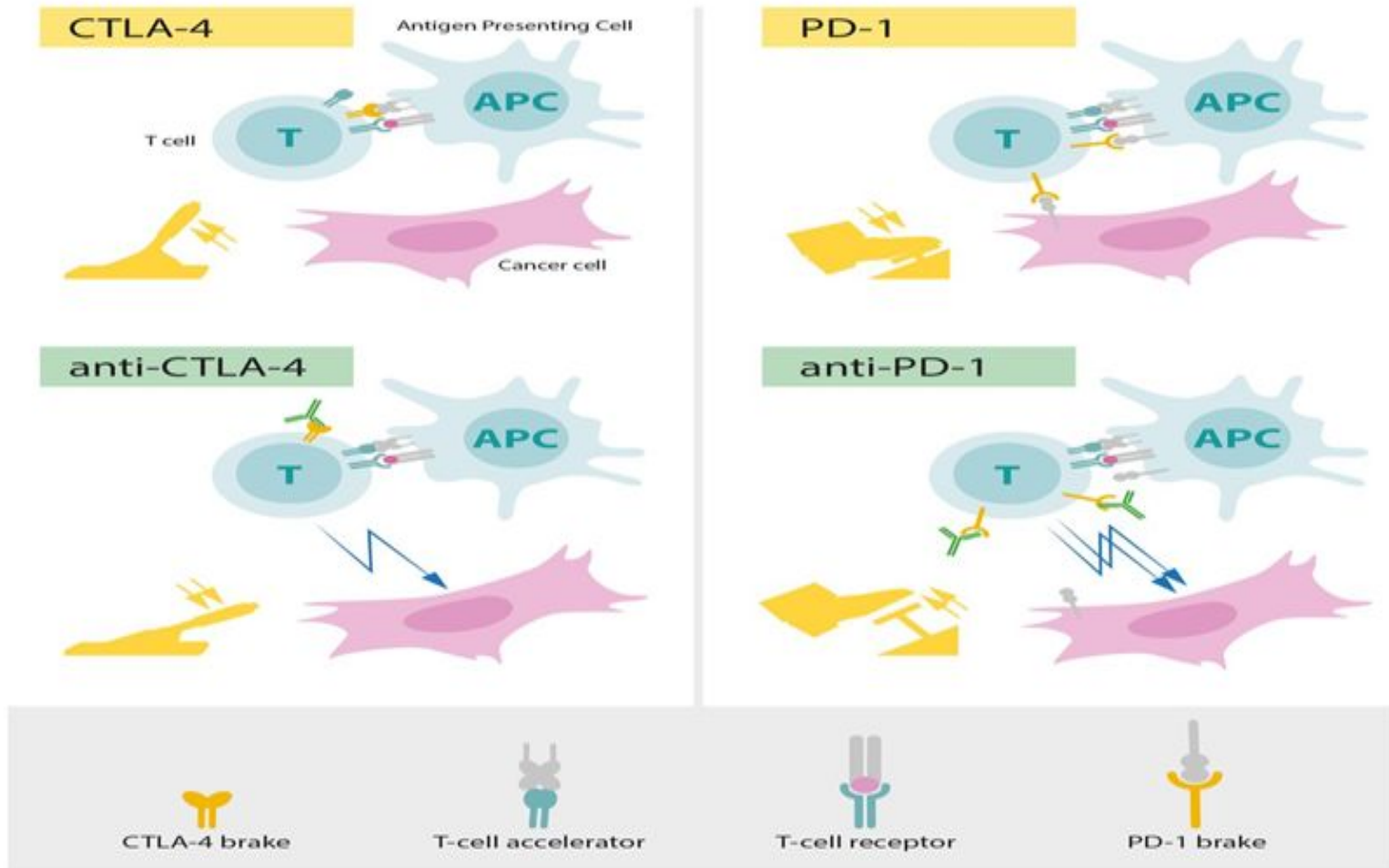
Da tempo è noto che il sistema immunitario in determinate condizioni ha tutte le capacità per riconoscere le cellule tumorali e distruggerle. Altrettanto noto è, però, che il tumore riesce a bloccare l'azione delle cellule immunitarie. Per questo motivo è ormai da decenni che vengono portati avanti diversi studi inerenti questo innovativo campo.

Il grande contributo dato dagli scienziati James P. Allison e Tasuku Honjo, entrambi vincitori del premio Nobel per la Medicina 2018, è stato quello di adottare un punto di partenza completamente differente che ha rivoluzionato la prospettiva nel campo dell'immunoterapia. Hanno scoperto, percorrendo studi differenti, che esistono delle molecole che frenano l'azione delle cellule immunitarie; eliminando questi *freni* (detti *checkpoint immunitari*) si mettono le cellule nella condizione di recuperare la loro capacità di aggredire il tumore.

A tale scopo sono stati creati degli *anticorpi monoclonali*, in particolare:

- L' *Ipilimumab*: progettato da Allison, dopo aver scoperto la proteina CTLA-4 (*T-cell inhibitory molecule*), molecola recettore nei linfociti T che inibisce la loro attività immunitaria. Questo anticorpo, legandosi al recettore, riattiva il linfocita. Dagli studi effettuati dal 2010 sugli umani si sono avuti ottimi risultati per il trattamento del melanoma.
- Il *nivolumab*: uno dei primi anticorpi progettati dopo la scoperta di Honjo della proteina PD-1 (*programmed cell death protein*), anch'essa inibitore del sistema immunitario, per riattivare i linfociti T. Sono stati ottenuti sorprendenti risultati nel trattamento di pazienti con tumori polmonari e renali, con linfomi e melanomi a partire dal 2012.

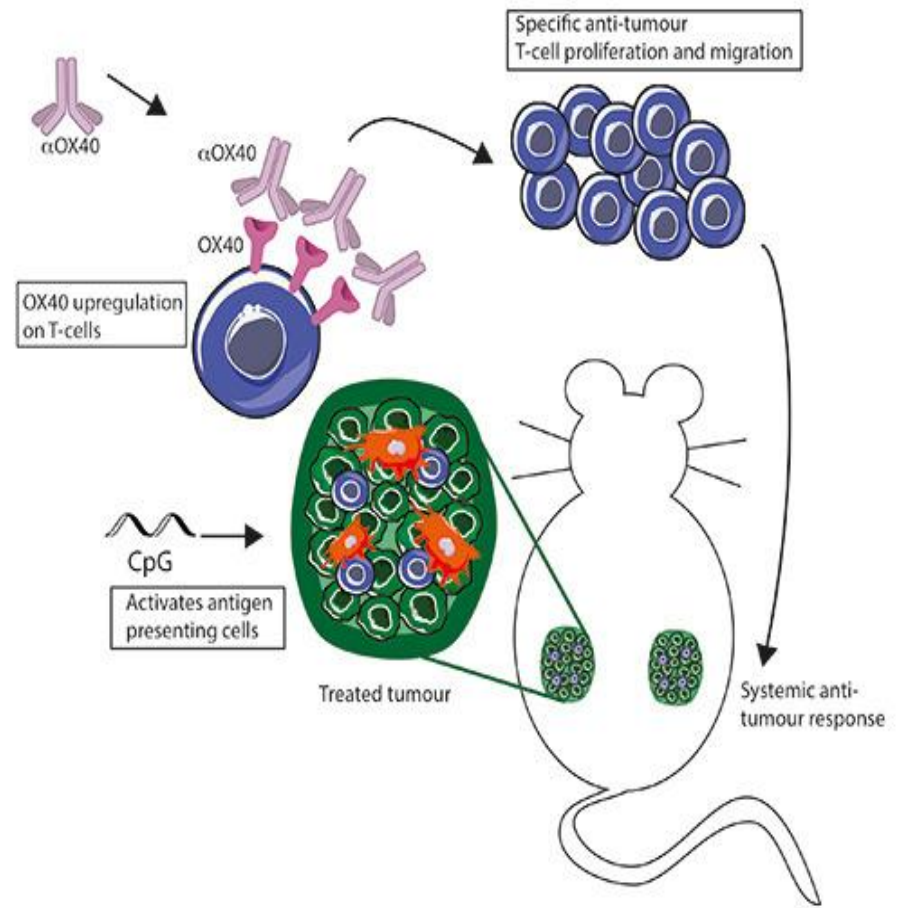
L'immagine mostra come si elimina il freno delle due proteine bersaglio, attivando i linfociti T contro il tumore.



Un altro significativo traguardo nel campo dell'*immunoterapia* è stato ottenuto dal Prof. Ronald Levy, docente di oncologia alla Stanford, grazie allo sviluppo di un potenziale *vaccino*. Sulla linea delle precedenti tecniche di immunoterapia, è riuscito ad escogitare un sistema per riattivare le cellule T del sistema immunitario, iniettando minime quantità (microgrammi) di due sostanze direttamente all'interno della massa tumorale primitiva. Questa tecnica, definita dai ricercatori *vaccinazione in situ*, consiste nell'inoculo di due sostanze:

- Il *Toll Like Receptor* (TLR-9): componente del sistema immunitario innato in grado di riconoscere dei *pattern* molecolari (sequenze strutturali) tipici dei patogeni.
- L'anticorpo anti OX40: anticorpo che contrasta l'inibitore (OX40) della differenziazione e della funzione dei linfociti T regolatori.

Basse dosi di TLR-9 inducono, sulla superficie delle cellule T, maggiori quantità di OX40; l'anticorpo anti OX40 ha invece il compito di guidare le cellule T direttamente contro le cellule tumorali. Questo trattamento, attivando le cellule T, ha dato ottimi risultati, in quanto il 96,6% dei soggetti murini ha avuto una completa remissione dei linfomi che, precedentemente innestati in zone diverse del corpo, sono atti a simulare una metastasi. Grazie a tali risultati si è passati nel 2018 alla sperimentazione sull'uomo.



Sempre nell'ambito dell'*immunoterapia* si stanno sviluppando nuove strategie di ultima generazione chiamate CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor*). Questa terapia cellulare si basa sull'ingegnerizzazione genetica dei linfociti T in modo tale da potenziarli per distruggere il tumore. Nello specifico, le cellule T vengono prelevate dal sangue del paziente, modificate geneticamente esprimendo sulla loro superficie il recettore CAR, capace di aumentare la risposta immunitaria, e reinfuse nel paziente stesso.

A differenza della strategia basata sugli inibitori dei *checkpoint immunitari*, le CAR-T rappresentano quella che può essere considerata la *medicina personalizzata dei tumori*, arrivate quest'anno anche in Europa.





# UNA GUERRA AL CANCRO

I traguardi raggiunti dallo sviluppo dell'immunoterapia sono stati raggiunti grazie allo studio dei soggetti murini.

## SPERIMENTAZIONE ANIMALE NELLO STUDIO DEL CANCRO

Fino ad oggi, gran parte della ricerca è stata svolta su animali, quasi sempre roditori (topi e ratti, soprattutto), per via delle loro piccole dimensioni, grande prolificità, vita media ridotta, poca simpatia verso di loro da parte del pubblico. Non possiamo ancora fare a meno degli studi che coinvolgono gli animali per trovare cure per il cancro. Alcuni effetti di una terapia compaiono infatti soltanto in un organismo completo, dotato di tutti gli organi che possono ricevere e modificare la terapia stessa.



# GLI ESPERIMENTI-ANIMALI : SONO RICHIESTI PER LEGGI

Questa "parentela" molecolare, fa sì che i risultati dei test in animali, sufficientemente simili a noi possono dare indicazioni utili. Per queste ragioni gli esperimenti negli animali sono richiesti per legge prima che si possa passare alla sperimentazione clinica nell'uomo.

La legge peraltro rispecchia un'esigenza diffusa fra i pazienti —————→ **La sicurezza e l'assenza di effetti collaterali**

Si tratta comunque di sperimentazioni che sono regolate da norme che tutelano il benessere degli animali e ne limitano l'utilizzo al minimo indispensabile.

Per ogni sperimentazione animale è obbligatorio:

AUTORIZZAZIONE DEL  
MINISTERO DELLA SALUTE

IMPORTANZA DELLA RICERCA

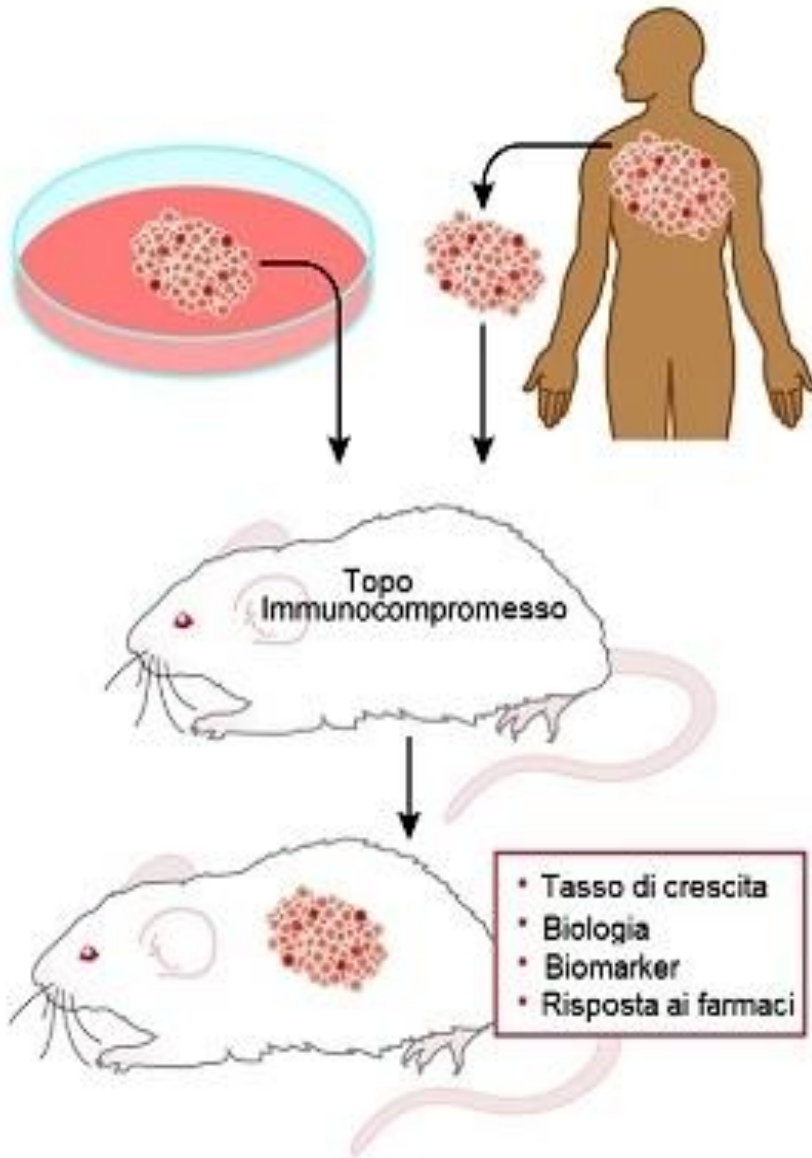
IMPOSSIBILITA' DI CONDURLA CON SISTEMI ALTERNATIVI

GARANZIE SUGLI ANIMALI



# TOPI OGM-IMMUNODEFICIENTI

Topi geneticamente modificati in modo da silenziare il loro sistema immunitario.



Si utilizzano da anni modelli murini geneticamente modificati in modo da silenziare il loro sistema immunitario.

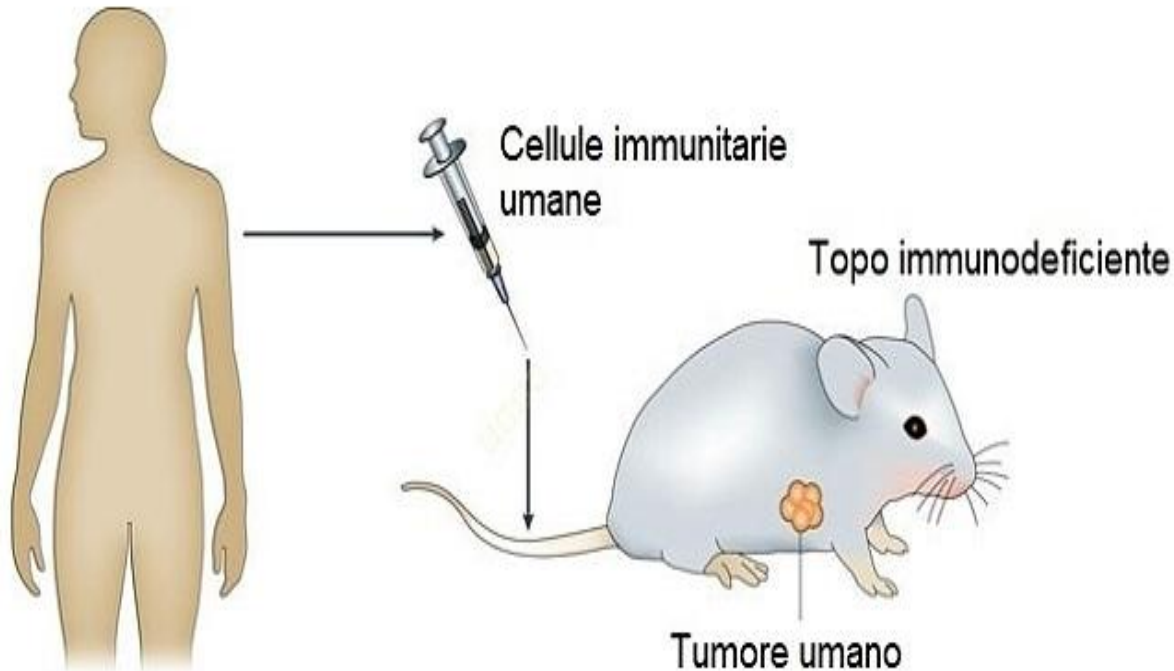
Le moderne tecnologie di manipolazione genetica permettono infatti di “spegnere” uno o più geni essenziali per la maturazione delle cellule immunitarie, generando topi parzialmente o completamente **immunodeficienti** e rendendo quindi possibile il trapianto di tumori umani.

La presenza di un sistema immunitario funzionante, infatti, riconoscerebbe le cellule tumorali umane come estranee, causandone il rigetto.

I “vecchi” modelli rischiano però di non essere all’altezza delle terapie oncologiche di ultima generazione. Come gli immunomodulatori, farmaci che appunto interagiscono con il sistema immunitario.

# IMMUNO-AVATAR

Un topo ripopolato con il sistema immunitario del paziente



Il modello di partenza è sempre un topo immunodeficiente, nel quale vengono trapiantati non solo il tumore, ma anche le cellule immunitarie del paziente umano isolate dal suo sangue periferico, che vanno a sostituire quelle murine precedentemente silenziate: si ottiene così un topo **“umanizzato”**, una rappresentazione immunologica del paziente. Nell’immuno-avatar i due attori principali, il tumore e il sistema immunitario ricostituito, possono interagire tra loro e con i farmaci somministrati, riproducendo più o meno fedelmente quello che vedremmo nel paziente.

# IMMUNO-AVATAR

## VANTAGGI:

1. permette ai medici di **predire la reazione del paziente al farmaco** in una maniera più completa, tenendo conto di diverse variabili (come il sistema immunitario);
2. **limita i danni collaterali**;
3. individua per ciascun paziente **una terapia “su misura”**;
4. si testa la validità e la sicurezza dei **farmaci immunoterapici** prima della somministrazione nell'uomo.

## SVANTAGGI:

1. gli immuno-avatar, dopo poche settimane, si ammalano della cosiddetta “**malattia da trapianto contro l'ospite**”, causata dalla non compatibilità tra le cellule immunitarie umane inoculate e quelle proprie del topo e dall'esito mortale.  
Una possibile soluzione, per quantomeno contrastare l'insorgenza di questa malattia, potrebbe essere mediata da cellule specifiche del sistema immunitario.

L'avvento delle immunoterapie ha richiesto un cambio di prospettiva importante nell'utilizzo dei modelli animali per la ricerca biomedica. Non è più solo il tumore, ma anche e soprattutto la sua interazione con l'organismo ospite, ed in particolare col suo sistema immunitario, ad essere presa in considerazione: questo ha gettato le basi per una migliore comprensione dell'oncogenesi e per trattamenti sempre più di precisione.



Quando si vuole, quindi, testare l'effettiva risposta di un **farmaco**, in questo caso **immunoterapico**, si deve pensare che stiamo facendo riferimento a delle sostanze, molecole, capaci di interagire con i processi dell'organismo.

La composizione delle particelle, dimensione, concentrazione, forma, stato di aggregazione, reattività e carica superficiale, potenziali di attrazione elettrostatica, metodi di sintesi e modificazione sono fattori che comportano conseguenze non piacevoli come : la tossicità .

Per **tossicità** si intende la capacità di una sostanza, a determinate dosi o concentrazioni, di provocare danni e rischi anche gravi, acuti o cronici a carico degli organismi viventi ai quali sia stata somministrata o che siano venuti in contatto con essa. Danni riscontrabili anche nei topi da laboratorio che dovrebbero essere da evitare, causando interferenza sull'esattezza dei risultati.

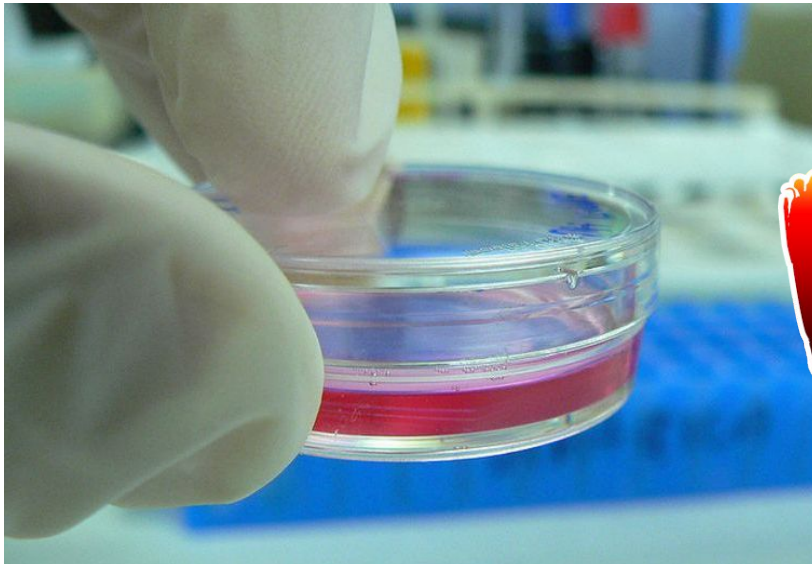
Risulta, quindi, estremamente importante valutare la risposta specifica di cellule e tessuti (sotto condizione di esposizione acuta o cronica e a dosi farmacologiche o tossicologiche) ad ogni nanocomposito candidato tramite dei test preliminari :

- ***in vitro***, ovvero:
  - citocompatibilità: permette di stabilire la citotossicità di un materiale, valutando se l'interazione con il biomateriale provoca la morte o alterazioni negative delle cellule;
  - emocompatibilità: permette di stabilire il grado di coagulazione del sangue sui biomateriali o sui dispositivi che entrano in contatto con il sangue

# IN VITRO vs IN VIVO

Differenza tra i due tipi principali di modelli sperimentali

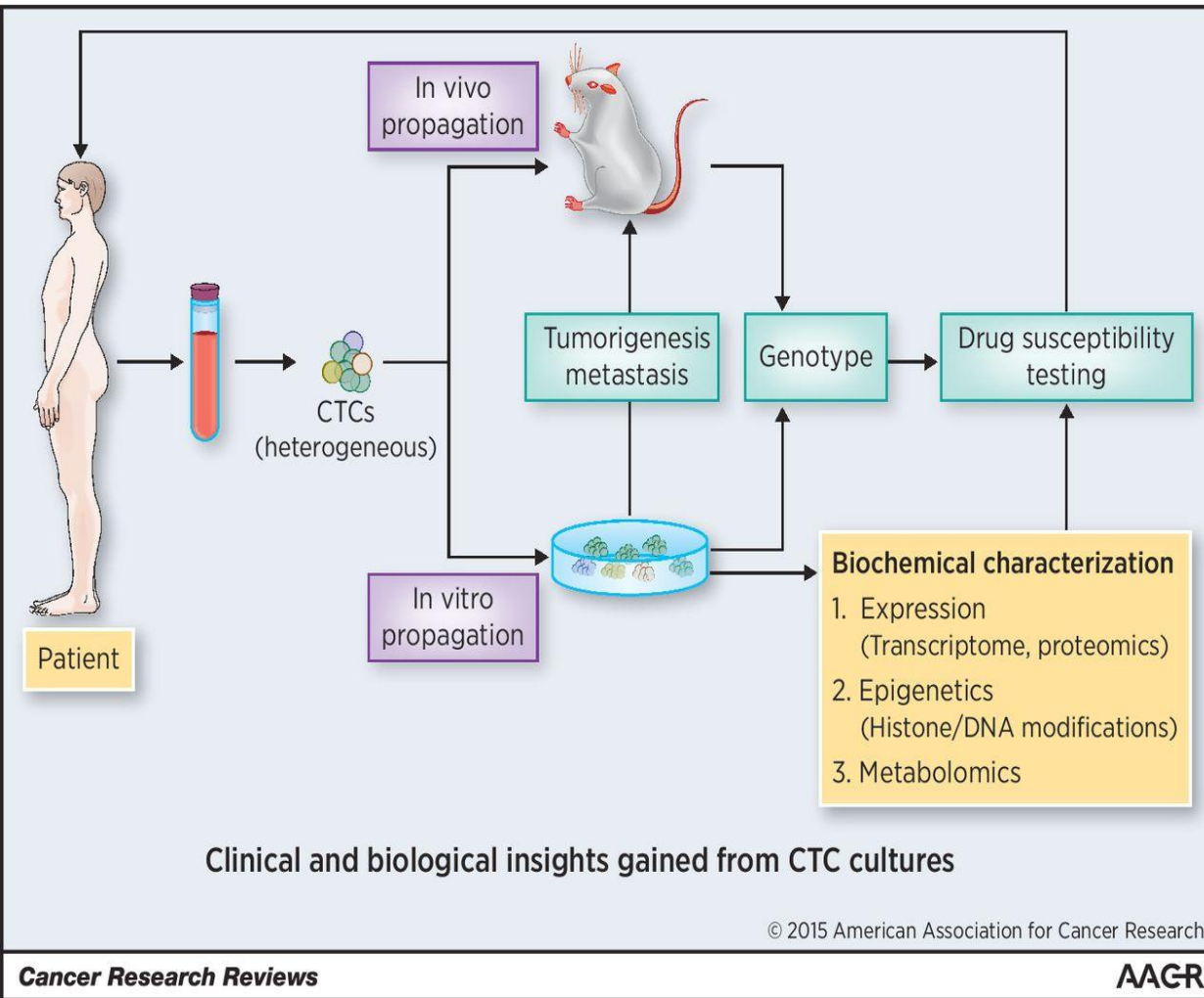
- ❖ in vitro → la ricerca avviene in ambienti artificiali controllati cioè fuori dalla cella in un ambiente artificiale che è una ricostruzione del modello biologico. Gli esperimenti vengono eseguiti in ambienti di vetro in estratti senza cellule e biomolecole purificate o parzialmente purificate
- ❖ in vivo → la ricerca avviene all'interno dei sistemi viventi a condizioni cellulari naturali cioè all'interno della cella in condizioni naturali. Gli esperimenti vengono effettuati all'interno di cellule viventi o organismi senza manipolare le condizioni.



VS



# IN VITRO vs IN VIVO



Le CTC possono essere inoculate direttamente nei topi o coltivate *in vitro*.

Le colture CTC coltivate *in vitro*, offrono :

-un sistema più versatile per la genotipizzazione;

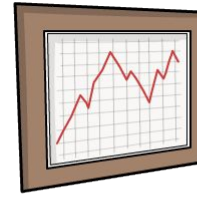
-un'analisi completa biochimica e funzionale di queste cellule tumorali, fornendo informazioni su presunti bersagli terapeutici;

-l'identificazione dei profili di sensibilità ai farmaci utile nella gestione clinica personalizzata del paziente

La figura delinea gli approcci che possono essere utilizzati per propagare i CTC

## Osservazioni cliniche

Il termine "clinica" indica la reale osservazione e la cura di pazienti malati.



## Epidemiologia

Consiste nello studio dello stile di vita di larghe fasce di popolazione, e nella correlazione di questo con le malattie che insorgono.

# METODI DI STUDIO moderni ed efficaci

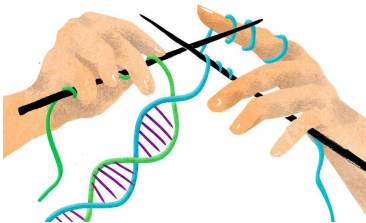
## Ricerca in vitro

Gli scienziati possono realizzare colture cellulari dello specifico tumore di un dato paziente, e provare su di esse i vari composti.



## Terapia genica

Dall'osservazione di esseri umani malati di cancro, i ricercatori sono riusciti a scoprire che alcuni geni attivano e disattivano il proliferare incontrollato di cellule maligne. Si stanno progettando cure mirate ai geni.



# BIBLIOGRAFIA

- **"Mechanical cues control mutant p53 stability through a mevalonate – RhoA axis"** - Eleonora Ingallina, Giovanni Sorrentino, Rebecca Bertolio, Kamil Lisek, Alessandro Zannini, Luca Azzolin, Luisa Ulloa Severino, Denis Scaini, Miguel Mano, Fiamma Mantovani, Antonio Rosato, Silvio Bicciato, Stefano Piccolo & Giannino Del Sal - Nature Cell Biology volume 20, pages 28–35 (2018).
- **"Manuale per la valutazione del rischio da esposizione ad agenti chimici pericolosi e ad agenti cancerogeni e mutageni"** - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, in collaborazione con Arpa e Inail.
- **"DNA damage response inhibition at dysfunctional telomeres by modulation of telomeric DNA damage response RNAs"** - Francesca Rossiello, Julio Aguado, Sara Sepe, Fabio Iannelli, Quan Nguyen, Sethuramasundaram Pitchiaya, Piero Carninci & Fabrizio d'Adda di Fagagna - Received 6 May 2016 | Accepted 17 Nov 2016 | Published 27 Feb 2017 - Nature Communications.
- **"Manuale di Tecniche di Registrazione dei Tumori"**, a cura di Stefano Ferretti, Adriano Giacomini e del gruppo di lavoro AIRTUM.
- **"Guida all'uso clinico dei biomarcatori in Oncologia 2010"**, a cura di Massimo Gion, Chiara Trevison, Silvia Pregno, Aline S.C. Fabricio; Edizioni Biomedica.
- **"I numeri del cancro in Italia 2017"**, a cura de Il pensiero Scientifico Editore, edizione 2017.
- **"Ruolo della fisica della matrice extracellulare come determinante della progressione della malattia neoplastica"** - Roberta Ramilli, Tesi Ingegneria Biomedica, UniBo.
- **"Translational reprogramming in tumour cells can generate oncoselectivity in viral therapies"** - Eneko Villanueva, Pilar Navarro, Maria Rovira-Rigau, Annarita Sibilio, Raul Mendez & Cristina Fillat - Received 21 Oct 2015|Accepted 2 Feb 2017|Published 16 Mar 2017 - Nature communications;
- Nanni, P., Gatta, V., Menotti, L., De Giovanni, C., Ianzano, M., Palladini, A., ... Lollini, P.-L. (2013). **Preclinical Therapy of Disseminated HER-2+ Ovarian and Breast Carcinomas with a HER-2-Retargeted Oncolytic Herpesvirus**. PLoS Pathogens, 9(1), e1003155. doi:10.1371/journal.ppat.1003155
- **"The tissue organization field theory of cancer: a testable replacement for the somatic mutation theory"** - Ana M. Soto and Carlos Sonnenschein (2008)
- **"Fibroblast in cancer"** - Raghu Kalluri and Michael Zeisberg (2006)
- **"Clonal evolution in cancer"** - Mel Greaves and Carlos C. Maley (2012)
- Sanmamed, M.F., Chester, C., Melero, I., and Kohrt, H. (2016). **Defining the optimal murine models to investigate immune checkpoint blockers and their combination with other immunotherapies**. Ann. Onc. 00, 1-9.
- Sanmamed, M.F. et al. (2015). **Nivolumab and urelumab enhance antitumor activity of human T lymphocytes engrafted in Rag2-/-IL2Rnull immunodeficient mice**. Cancer Res. 75, 3466-78.



# SITOGRAFIA

- <https://it.wikipedia.org>
- <https://www.airc.it/>
- <http://www.treccani.it>
- <https://www.aiom.it/>
- Screening oncologici- [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_774\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_774_allegato.pdf)
- Caspasi - [http://www.pianetachimica.it/mol\\_mese/mol\\_mese\\_2004/08\\_Caspasi/Caspasi\\_1\\_ita.html](http://www.pianetachimica.it/mol_mese/mol_mese_2004/08_Caspasi/Caspasi_1_ita.html)
- <https://www.osservatoriomalattia.it/attualita/14022-immunoterapia-oncologica-una-ricerca-da-nobel>
- <https://sciencecue.it/topi-tumore-regredire-vaccino/13107/>
- [http://www.quotidianosanita.it/scienza-e-farmaci/articolo.php?articolo\\_id=58690](http://www.quotidianosanita.it/scienza-e-farmaci/articolo.php?articolo_id=58690)
- <https://ilbolive.unipd.it/it/news/nobel-medicina-2018-ad-allison-honjo>
- <https://sciencecue.it/tasuku-honjo-immunoterapia-tumori/14700/?fbclid=IwAR07O1WfVhJjx-jKngte-WrYxLt48lP0cNNytDfMmfJS2lfc7qcVZPazbl8>
- Video TedEd:
  - <https://www.youtube.com/watch?v=OciqJn8UJNQ&t=28s>
  - <https://www.youtube.com/watch?v=h2rR77VsF5c>
  - <https://www.youtube.com/watch?v=BmFEoCFDi-w>
  - <https://www.youtube.com/watch?v=22lGbAVWhro&t=4s>

***GRAZIE PER L'ATTENZIONE !***

