www.medicalsystems.it

ISSN 0394 3291

Caleidoscopio
Italiano

A cura di
Anna Di Lonardo, Corrado Fagnani,
Simonetta Pulciani

Applicazioni dei microarray (1)

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

222

... il futuro ha il cuore antico

MEDICAL SYSTEMS SpA

Tariffa R.O.C.: "Poste Italiane S.p.a. - Sped. in A.P. - D.L. 353/2003, (conv. in L. 27/02/2004 n. 46) art. 1 comma 1, DCB Genova" - n° 222- Marzo 2009 - Dir. resp.: Sergio Rassu - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: Nuova ATA - Genova

Caleidoscopio
Italiano

A cura di
Anna Di Lonardo, Corrado Fagnani, Simonetta Pulciani

Istituto Superiore di Sanità. Roma

Applicazioni dei microarray (1)

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

222

... il futuro ha il cuore antico

MEDICAL SYSTEMS SpA

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

INFORMAZIONI GENERALI. Caleidoscopio pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'International Committee of Medical Journal Editors. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

TESTO. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte ovvero 100-130.000 caratteri (spazi inclusi). Si invita a dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi.

TABELLE E FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse. Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

UNITÀ DI MISURA. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre il dattiloscritto, le fotografie, una copia del testo in formato .doc oppure .rtf, ed copia di grafici e figure in formato Tiff con una risoluzione di almeno 240 dpi, archiviati su CD in buste separate.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista Caleidoscopio rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41).

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al seguente indirizzo:

Restless Architect of Human Possibilities sas
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Editoriale

Il numero rilevante di coloro che hanno collaborato alla realizzazione di questa splendida monografia ci induce a presentarli per poter dedicare loro tutto lo spazio che meritano.

Il Dottor Corrado Fagnani, matematico, ha una posizione di ricercatore presso il Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute (CNESPS) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) di Roma, e fa parte del gruppo di ricerca che gestisce il Registro Nazionale Gemelli. E' coinvolto in numerosi progetti di epidemiologia genetica, alcuni dei quali in collaborazione con i Registri Gemelli di altri Paesi europei. E' autore di diverse pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali ed internazionali.

La Dottoressa Simonetta Pulciani, laureata in Fisica, si è sempre interessata dei meccanismi di trasformazione cellulari e di retrovirus. Più recentemente si è interessata di microarray, epidemiologia genetica e malattie rare.

Attualmente svolge la sua attività a carattere istituzionale, presso il Centro per la Ricerca e la Valutazione dei prodotti Immunobiologici, occupandosi di problematiche legate all'uso dei farmaci ricombinanti. E' autore di diverse pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali ed internazionali.

La Dottoressa Anna Di Lonardo, laureata in Scienze biologiche e specializzata in Patologia clinica si è occupata di Virologia oncologica in particolare di papillomavirus, affrontando sia ricerche di base che traslazionali/cliniche.

Più recentemente si è interessata alle infezioni da enterovirus, e alla tecnologia dei microarray. Attualmente è ricercatore presso il Centro per la Ricerca e la Valutazione di prodotti Immunobiologici dell'Istituto Superiore di Sanità e qui svolge attività di carattere istituzionale relativa al controllo del vaccino antipoliomielitico. E' autore di diverse pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali ed internazionali.

La Dottoressa Eleonora Aricò è laureata in Scienze Biologiche. Terminati gli studi, ha iniziato a svolgere la sua attività come ricercatrice presso l'Isti-

tuto Superiore di Sanità. Ha anche trascorso due anni presso il National Institute of Health (Bethesda, USA), dove ha acquisito conoscenze tecniche e culturali sull'uso del microarray. E' autrice di diverse pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali ed internazionali.

La Dottoressa Cinzia Bascietto è laureata in Medicina e Chirurgia e specializzata in Pediatria. Ha collaborato con il Servizio di Endoscopia Digestiva della Chirurgia Pediatrica dell'Ospedale "Bambin Gesu'" di Roma. E' autrice di numerose pubblicazioni scientifiche.

Il Dottor Francesco Bascietto è laureato in Medicina e Chirurgia e specializzato in Puericultura e Pediatria. E' stato Direttore dell'U.O. complessa di Pediatria dell'Ospedale di Sulmona, occupandosi prevalentemente di malattie gastrointestinali, autoimmuni ed infettive. Nel corso della sua carriera professionale ha avuto numerosi incarichi ed è docente di Auxologia e Gastroenterologia presso la Scuola di Specializzazione in Clinica Pediatrica. E' autore di numerose pubblicazioni scientifiche.

La Dottoressa Irene Canini ha la laurea in "Tecnico di laboratorio biomedico nella classe delle professioni sanitarie tecniche" ed à collaboratore tecnico presso l'Istituto Superiore di Sanità. Ha partecipato a diversi progetti di ricerca immuno-oncologici ed alla messa in opera e della validazione della tecnologia dei microarray. E' autrice di diverse pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali ed internazionali.

Il Dottor Panfilo Cantelmi è laureato in Medicina e Chirurgia e specializzato in Patologia Clinica, Igiene e Medicina preventiva in Sanità Pubblica ed Ospedaliera. Dal 1979 lavora come Dirigente Medico presso l'U.O. di Patologia Clinica dell'Ospedale di Sulmona, e si occupa di chimica clinica e malattie autoimmuni. Fa parte del Centro di Riferimento per lo studio ed il follow-up della malattia celiaca. Ha collaborato ad alcuni studi multicentrici ed è autore di pubblicazioni scientifiche

Il Dottor Armando Capanna è laureato in Medicina e Chirurgia e specializzato in Ostetricia e Ginecologia, Chirurgia Generale e perfezionato in Chirurgia Colon-Proctologica. Dal 1989 al 2004 ha lavorato presso l'U.O. complessa di Chirurgia Generale. Dal 2004 è Dirigente Responsabile della Struttura Semplice Dipartimentale di Endoscopia Chirurgica del P.O. di Sulmona. Si occupa prevalentemente di malattie dell'apparato gastrointestinali ed è coinvolto nel Centro di Riferimento per lo studio ed il follow-up della malattia celiaca. E' autore di oltre 20 pubblicazioni scientifiche.

Il Dottor Luciano Castiello ha conseguito la laurea specialistica in Biotecnologie Genomiche. Attualmente è borsista presso l'Istituto Superiore

di Sanità e si occupa delle applicazioni dei microarray nel monitoraggio delle terapie interferoniche.

La Dottoressa Yvonne D'Alesio è laureata in Scienze Biologiche e specializzata in Biochimica Clinica. Nel corso della sua carriera professionale ha lavorato presso il Laboratorio di Patologia Clinica dell'Ospedale di Lanciano e di Pescara e il Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Sulmona occupandosi di patologie genetiche, autoimmuni, infettive e virali. Dal 2003 lavora presso la U.O. di Anatomia Patologica dell'Ospedale di Sulmona e fa parte del Centro Regionale per lo studio e il follow-up della malattia celiaca. È autrice di diverse pubblicazioni.

La Dottoressa Alessia Di Fonso è laureata in Scienze Biologiche ed è iscritta al corso di Specializzazione in Genetica Medica presso l'Università di Chieti. Ha lavorato presso il Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Sulmona, occupandosi esclusivamente di Biologia Molecolare applicata a patologie autoimmuni ed infettive. Attualmente è borsista presso l'Università degli studi di Chieti e si interessa di cellule staminali.

Il Dottor Camillo Di Tommaso è laureato in Medicina e Chirurgia e specializzato in Gastroenterologia, Medicina Interna, Geriatria e Gerontologia. Dal 1991 è Direttore dell'Unità Operativa complessa di Medicina dell'Ospedale di Sulmona. Si occupa prevalentemente di malattie croniche intestinali e di patologie epatiche. Oltre all'attività di docente è anche responsabile del Centro Regionale per lo studio e il follow-up della malattia celiaca per gli adulti, ASL Avezzano Sulmona. E' autore di numerose pubblicazioni scientifiche.

La Dottoressa Lucia Gabriele è laureata in Scienze Biologiche e specializzata in Genetica Applicata. Ha trascorso un periodo di formazione presso il Laboratorio di Immunopatologia del National Institute of Health (Bethesda, USA). Attualmente, dirige un gruppo di ricerca coinvolto nel progetto del Laboratorio di Ricerca dei Microarray, avviato all'Istituto Superiore di Sanità (ISS) da qualche anno. Uno degli interessi principali della dottoressa Gabriele è sviluppare piattaforme di microarray innovative nel campo biomedico, con particolare attenzione all'area oncologica. E' autrice di numerose pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali ed internazionali.

Il Dottor Leonardo Geraci è laureato in Medicina e Chirurgia ed è specializzato in Ematologia, Oncologia e Medicina Interna. E' stato Dirigente Medico presso il Servizio di Ematologia dell'Ospedale di Pescara e Responsabile del Centro Trasfusionale e del Servizio di Ematologia dell'Ospedale di Sulmona. Fa parte del Centro Regionale per lo studio e il follow-up della malattia celiaca. E' autore di numerose pubblicazioni scientifiche in ambito ematologico.

Il Dottor Germano Gerosolimo è laureato in Scienze Biologiche e specializzato in Biochimica. È stato ricercatore presso il Consorzio Mario Negri Sud. Dal 2000 lavora presso il Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Sulmona dove si interessa di patologie genetiche, autoimmuni, infettive e virali. Fa parte del Centro Regionale per lo studio e il follow-up della malattia celiaca. È autore di diverse pubblicazioni scientifiche.

Il Dottor Stefano Lorenzetti è laureato in Scienze Biologiche e in Scienze della Nutrizione Umana. Dal 2006 lavora presso il Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare dell'Istituto Superiore di Sanità. Attualmente è docente per l'insegnamento "Biologia Molecolare - Tossicologia" presso la Scuola di Specializzazione in Scienza dell'Alimentazione, dell'Università "Tor Vergata" di Roma. E' autore di diverse pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali e internazionali.

Il Dottor Mariano Magrì è laureato in Medicina e Chirurgia e specializzato in Pediatria. Ha lavorato presso la Divisione di Neonatologia dell'Ospedale di Chieti. Dal 1999 è Dirigente Medico presso l'U.O. di Pediatria dell'Ospedale di Sulmona e si occupa prevalentemente di problemi gastroenterologici ed intolleranze alimentari in età pediatrica. Attualmente contribuisce alla realizzazione del Centro Regionale per lo studio e il follow-up della malattia celiaca. E' autore di numerose pubblicazioni scientifiche.

La Dottoressa Cinzia Marcantonio è laureata in Scienze Biologiche e specializzata in Patologia Clinica. Dal 1994 svolge attività di ricerca sul virus dell'Epatite C (HCV) presso il Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità. Attualmente è coinvolta in studi riguardanti: meccanismi di immunità innata e analisi dell'espressione genica nelle infezioni da virus dell'HCV; processi molecolari di cancerogenesi nel linfoma da HCV. E' autore di varie pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali.

La Dottoressa Stefania Parlato è laureata in Scienze Biologiche. Svolge la sua attività di ricerca presso l'Istituto Superiore di Sanità e ha esperienza nell'uso di modelli pre-clinici per studi sia oncologici che di patogenesi di agenti infettivi. E' autrice di diverse pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali ed internazionali.

Il Dottor Flavio Rispoli è laureato in Medicina e Chirurgia e specializzato in Gastroenterologia. Dal 1993 è Dirigente Medico di I livello presso l'U.O. di Medicina dell'Ospedale di Sulmona. Dal 2004 si è occupato di aspetti fisiopatologici dell'apparato gastro-enterico. Dall'istituzione del Centro di Riferimento Regionale delle malattie rare (morbo celiaco) si è dedicato allo

studio ed al follow-up dei pazienti con enteropatia da glutine. E' autore di numerose pubblicazioni scientifiche.

Il Dottor Marco Salvatore è laureato in Biologia e specializzato in Genetica Applicata. Dal 2001 lavora presso il Centro Nazionale Malattie Rare dell'Istituto Superiore di Sanità occupandosi di assicurazione e standardizzazione di qualità dei test genetici per selezionate patologie rare. Dal 2001 è impegnato nella caratterizzazione di marcatori molecolari e citogenetici di malattie rare E' autore di diverse pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali e internazionali.

La Dottoressa Paola Tataseo è laureata in Scienze Biologiche, ha conseguito il Dottorato di Ricerca in "Biologia Cellulare e Molecolare" e si è specializzata in Applicazioni Biotecnologiche, Patologia Clinica e Genetica Medica. È stata ricercatrice presso l'Università " Tor Vergata" di Roma. Dal 1993 dirige il laboratorio di Biologia Molecolare presso il Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Sulmona. Fa parte del Centro Regionale per lo studio e il follow-up della malattia celiaca. Svolge attività di docente ed è autrice di numerose pubblicazioni scientifiche.

La Dottoressa Mara Viganotti è laureata in Scienze Biologiche. Attualmente svolge le sue attività di studio e ricerca presso il Centro Nazionale Malattie Rare dell'Istituto Superiore di Sanità.

Sergio Rassu

La Tecnologia dei Microarray nella Ricerca Oncologica Biomedica e Clinica

Eleonora Aricò, Stefania Parlato, Luciano Castiello, Canini Irene, Lucia Gabriele
Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Microarray e la ricerca oncologica

L'avvento dei microarray ha aperto nuove frontiere nella ricerca oncologica con conseguenze rilevanti nella diagnosi, prognosi e terapia di alcuni tumori (Pusztai L., 2006). Inizialmente descritta per misurare livelli di trascritti di RNA di migliaia di geni in un singolo esperimento, la tecnologia dei microarray ha subito negli ultimi anni un'implementazione tecnologica così rapida da rappresentare un approccio unico per stratificare pazienti oncologici e per definire parametri di progressione della malattia (Mazumder A. e Wang Y., 2006). In aggiunta, al momento sono in corso numerosi studi diretti a verificare la sua potenzialità come strumento predittivo della risposta a trattamenti terapeutici (Foekens J.A. et al., 2008). La tecnologia dei microarray, fra le analisi genomiche "high-throughput", è forse la metodologia più matura e di successo che ha cambiato l'approccio molecolare alla ricerca biomedica e clinica e rende reale l'ipotesi della cosiddetta "medicina personalizzata" in oncologia.

Le attuali applicazioni del microarray alla ricerca oncologica e non sono molteplici, e non si limitano alla valutazione di eventuali alterazioni dell'espressione genica mediante "gene profiling". Esse, infatti, consentono di evidenziare numerose e complesse alterazioni molecolari del genoma, come polimorfismi a singolo nucleotide ("single nucleotide polymorphisms" [SNP]), aberrazioni nei profili di metilazione, variazioni nel numero di copie geniche, splicing alternativi dell'RNA, cambiamenti dell'attività funzionale di fattori di trascrizione e presenza di patogeni (Hoheisel J.D., 2006, Trevino V. et al., 2007). Ad esempio, lo studio di aberrazioni cromosomiche e del loro ruolo nello sviluppo e nel decorso di molti tumori, è stato fortemente potenziato dall'introduzione di un approccio di microarray conosciuto come "array Comparative Genomic Hibridization" (aCGH). Allo stesso modo, l'analisi degli SNP e del loro ruolo nella suscettibilità e nella progressione tumorale, è stata notevolmente rafforzata dall'introduzione di questo

approccio metodologico, che permette di rilevare la presenza di SNP noti o sconosciuti nell'intero genoma umano mediante esperimenti relativamente semplici e rapidi rispetto alla tecnologia standard del sequenziamento (Gresham D. et al., 2008).

Mentre molte di queste applicazioni si trovano ancora in una fase di sviluppo e validazione, l'analisi dei profili di espressione genica ha subito un processo di profonda ottimizzazione della metodologia, che può oggi avvalersi di array di alta qualità, standardizzazione dei protocolli di ibridazione, tecnologie di analisi delle immagini accurate e approcci computazionali robusti, diventando uno strumento molto potente e relativamente semplice per correlare condizioni fisiologiche e patologiche a profili distintivi di espressione genica, conosciuti come "gene expression signatures" (van't Veer L.J. et al., 2008).

Approcci analitici agli studi di "gene profiling" con la tecnologia dei microarray

In virtù della sua versatilità e delle sue caratteristiche di rapidità e riproducibilità, la tecnologia dei microarray si è rivelata uno strumento di straordinaria potenzialità negli studi di medicina traslazionale mirati al trasferimento alla clinica delle conoscenze scientifiche e metodologiche acquisite dalla ricerca biomedica (Marincola F.M., 2007). Obiettivo degli studi di microarray nella ricerca traslazionale in oncologia è identificare biomarcatori, correlati a fattori clinico-patologici, che possano avere valore predittivo del decorso clinico o della risposta a terapie, rappresentare potenziali bersagli per terapie innovative e mirate, oppure aiutare la comprensione dei processi biologici alla base dello sviluppo del tumore. E' importante sottolineare che l'utilizzo dei microarray, se da una parte permette un approccio conoscitivo globale del sistema biologico in esame mediante la possibilità di allestire in tempi ridotti analisi su larga scala, dall'altra genera un'enorme mole di dati che può essere interpretata adeguatamente solo in presenza di un disegno sperimentale ben definito e di approcci analitici adeguati. Pertanto, negli studi di tipo oncologico è particolarmente importante selezionare gli strumenti statistici e matematici più adatti alle problematiche specifiche di volta in volta in esame (Simon R.M. et al., 2003).

I due principali procedimenti a cui vengono sottoposti i dati di gene profiling in studi oncologici sono rappresentati dal "clustering gerarchico non supervisionato" e dal "clustering gerarchico supervisionato", ambedue finalizzati ad identificare gruppi sperimentali con differenze nei livelli di

espressione genica e che nella terminologia specifica vengono definiti classi di appartenenza. Questi due approcci si distinguono rispetto all'utilizzo o meno di parametri addizionali, come quelli clinici, per definire le classi. Nel caso di "clustering gerarchico non supervisionato" i campioni vengono raggruppati in classi in base alla similitudine dei profili di espressione genica, mediante un approccio analitico che non si avvale di categorizzazioni pregresse dei campioni basate sulla natura degli stessi, quali parametri clinici. Una possibile applicazione di questo approccio è la cosiddetta "class discovery", mirata ad identificare sottogruppi di campioni con profili di espressione genica simili all'interno di un gruppo più ampio di campioni, come prelievi bioptici da pazienti con un particolare tipo di tumore. Una volta riscontrate similitudini geniche significative, capaci di distinguere in modo univoco sottogruppi distinti con caratteristiche biologiche simili, i profili di espressione genica vengono usati per una più fine classificazione dei tumori in esame, che potranno così essere assimilati ad uno dei possibili sottogruppi. Ad esempio, la classificazione non supervisionata di campioni di carcinoma mammario ha permesso l'identificazione di cinque sottotipi di tumore che non erano stati caratterizzati con altre metodiche (Perou C.M. et al., 2000).

Il "clustering supervisionato" è invece un approccio analitico finalizzato a cercare geni distintivi che possono identificare correttamente gruppi sperimentali e si basa sulla suddivisione dei campioni in classi, per le quali siano già note alcune caratteristiche specifiche (ad esempio, la risposta ad un dato trattamento versus la mancata risposta allo stesso trattamento). Questo tipo di strategia si avvale prevalentemente dello strumento biostatistico della "class comparison", analisi finalizzata ad investigare quali geni siano differenzialmente espressi tra due classi predefinite. In studi oncologici, le classi messe a confronto, scelte indipendentemente dai profili genici, spesso rappresentano categorie distinte di tumori, con differenze inerenti lo stadio tumorale, il sito primario, la presenza di mutazioni genetiche oppure la risposta a terapie. Analisi di "class comparison", ad esempio, vengono correntemente effettuate in studi finalizzati a valutare differenze esistenti tra i profili di espressione genica di tessuti normali e tumorali, alla ricerca di informazioni utili a comprendere i meccanismi molecolari alla base della fisiologia dei tumori. Più recentemente, questo approccio è stato utilizzato per studi traslazionali, come la valutazione dei cambiamenti del profilo di espressione genica in carcinoma mammario metastatico pre- e post-trattamento con Erlotinib (Yang S.X. et al., 2005). In ogni caso, l'interpretazione del significato biologico delle liste di geni generate da questi confronti e definite come espresse in maniera differenziale tra due classi risulta particolarmente importante e delicata e, attualmente, numerose risorse informatiche, come BRB-ArrayTools, sono disponibili online per facilitare questo compito (Simon R. et al., 2005). Studi più prettamente traslazionali, quali la ricerca di biomarcatori genetici poten-

zialmente predittivi di categorie patologiche come la gravità della malattia, la prognosi oppure la responsività ad una terapia, si avvalgono comunemente della "class prediction", uno strumento biostatistico che associa elementi di "clustering non supervisionato" alle conoscenze acquisite sulla base di indagini tra gruppi precedentemente ben definiti. Questa strategia di analisi è, infatti, mirata a sviluppare una funzione matematica in grado di prevedere a quale classe appartenga un campione sulla base del suo profilo di espressione genica. L'applicazione della "class prediction" passa attraverso diversi processi consequenziali, quali l'identificazione di uno o più gruppi di geni in grado di distinguere chiaramente due o più classi predefinite, lo sviluppo di parametri di un algoritmo matematico di tipo predittivo e, infine, la valutazione dell'accuratezza della predizione stessa (Simon R., 2005). Nella maggior parte dei casi, per applicare qualsiasi protocollo di ricerca di classificatori distintivi di una certa patologia, del suo decorso o della sua responsività ad una specifica terapia, un gruppo di tumori definito come "training set" viene usato per determinare un profilo di espressione genica distintivo e, quindi, un secondo gruppo di tumori (chiamati "validation" set) viene usato per saggiare quanto questo profilo di espressione genica sia adatto a classificare campioni che non sono stati preventivamente raggruppati (Simon RM, 2008). Tale approccio è risultato particolarmente efficace per identificare biomarcatori predittivi di pazienti con carcinoma della mammella primario ad alto rischio di recidiva dopo terapia locale (van de Vijver M.J. et al., 2002). Più recentemente, lo stesso approccio ha permesso di definire marcatori predittivi della risposta alla terapia con tamoxifene in pazienti con carcinoma mammario metastatico (Jansen M.P. et al., 2005).

In generale, nonostante le immense potenzialità della tecnolgia dei microarray in campo oncologico, è importante sottolineare che, prima che questi studi vengano introdotti nella routine della diagnostica medica, è necessario che si raggiunga un accettabile livello di standardizzazione metodologica e di validazione dei risultati ottenuti. In questo senso, prima che una lista di geni possa essere universalmente accettata come un classificatore prognostico o diagnostico di una certa patologia oncologica, è richiesto che questa venga validata in un numero sufficiente di studi clinici randomizzati, che garantiscano una certa omogeneità nel reclutamento e nel trattamento dei pazienti in esame. Ad oggi, gli approcci analitici e metodologici descritti hanno comunque permesso di raggiungere obiettivi importanti contribuendo in modo determinante alla conoscenza ed al trattamento dei tumori.

Diagnosi e prognosi in pazienti oncologici: potenzialità e limiti della tecnologia dei microarray

Dal punto di vista strettamente molecolare, il cancro è una "malattia genetica" che si sviluppa in seguito all'accumulo di diverse aberrazioni nell'espressione genica. Essenzialmente, molteplici e differenti mutazioni specifiche possono risultare nello sviluppo di tumori dissimili con comportamenti clinici diversi in termini di progressione della malattia e risposta alla terapia. In un quadro di tale complessità, è di fondamentale importanza riuscire a classificare, in modo preciso ed accurato, un dato campione in una categoria diagnostica definita. Attualmente in campo oncologico la maggior parte delle diagnosi, sulla base delle quali si definiscono prognosi ed interventi terapeutici, vengono realizzate per mezzo di caratterizzazioni morfologiche del tumore, spesso associate ad analisi per l'espressione e la funzione di singoli geni. Esempio rappresentativo di tale approccio è la diagnosi del cancro della prostata eseguita mediante l'analisi dell'antigene prostatico PSA. E' oggi noto che tumori con caratteristiche istopatologiche simili possono produrre decorsi clinici differenti e rispondere diversamente alla terapia, suggerendo l'esistenza di sottoclassi tumorali che, pur condividendo la stessa origine, presentano caratteristiche molecolari molto diverse difficilmente evidenziabili con gli approcci analitici attualmente disponibili (Chung C.H. et al., 2002). Idealmente, la classificazione molecolare dei tumori mediante analisi genomica apre la tanto auspicabile prospettiva della "medicina personalizzata" basata su diagnosi, prognosi e scelta di trattamenti terapeutici accurati e personalizzati.

Ad oggi, l'analisi sistematica di profili di espressione genica di campioni tumorali rappresenta l'applicazione del microarray più usata e standardizzata in campo oncologico, che ha concretamente contribuito ad una più accurata valutazione di molte patologie tumorali attraverso l'identificazione di profili definiti di espressione di gruppi di geni associati con specifiche caratteristiche tumorali. Uno dei primi esempi applicativi di utilizzo di analisi di microarray per definire classi diagnostiche in campo oncologico è rappresentato dalla classificazione di 38 pazienti leucemici, unicamente in base ai rispettivi profili di espressione genica, in sottoclassi di leucemia mieloide acuta (LMA) e leucemia linfocitica acuta (LLA), quest'ultima ulteriormente distinta nei due sottogruppi LLA a cellule B e LLA a cellule T (Golub T.R. et al., 1999). Vale la pena sottolineare che proprio grazie a questo studio è stato possibile identificare alcuni marcatori distintivi delle patologie in esame, come la mieloperossidasi e la terminal-transferasi. Più recentemente, sono stati definiti profili di espressione genica in 360 casi di LLA pediatrica che riflettono le 6 maggiori sottoclassi della patologia associate a variazioni citogenetiche defi-

nite, confermando il "proof-of-concept" che le classi citogenetiche possono essere accuratamente predette dai soli profili di espressione genica (Ross M.E. et al., 2003). A sostegno della potenzialità di approcci di microarray per la diagnosi e la prognosi di pazienti con LMA, due recenti studi hanno dimostrato, rispettivamente in 116 e 285 pazienti, l'associazione di ben descritte mutazioni citogenetiche con specifici profili di espressione genica. Inoltre, dal momento che le singole aberrazioni citogenetiche sono esse stesse predittive della sopravvivenza degli individui portatori, ne consegue che i profili di espressione genica hanno mostrato di avere un valore prognostico (Bullinger L. et al., 2004, Val.k P.J. et al., 2004). In aggiunta, le analisi di microarray descritte in questi lavori hanno permesso di definire, sulla base di due profili di espressione genica distinti, due sottogruppi di pazienti LMA con cariotipo normale associati a un diverso tasso di sopravvivenza. Nel complesso questi ed altri lavori successivi mostrano che la diversità dei parametri clinici osservata nei pazienti LAM è riconducibile a programmi molecolari distinti, e la concordanza dei dati ottenuti suggerisce la reale possibilità di definire una precisa ed affidabile tassonomia molecolare. Tuttavia, sebbene l'approccio dei microarray sembra avere un elevato potenziale diagnostico e prognostico in questa patologia, programmi integrati basati sull'utilizzo di nuovi approcci statistici per migliorare le correlazioni di dati all'interno di intergruppi di trials clinici sono necessari per ottimizzare il valore predittivo di questo approccio ed indirizzare i pazienti verso terapie specifiche.

Un'altra patologia oncologica per la quale gli approcci di microarray, a differenza delle attuali tecnologie di analisi patogenetiche, hanno permesso una stratificazione dei pazienti con diverso decorso della malattia è il linfoma diffuso a grandi cellule B (LDGCB). Studi iniziali di microarray hanno, infatti, consentito di distinguere due principali sottogruppi di LDGCB: uno che è assimilabile a cellule normali dei centri germinali e l'altro che ha caratteristiche simili a linfociti B del periferico attivati *in vitro* (Alizadeh A.A. et al., 2000). Questo studio e quelli simili che lo hanno seguito hanno non solo evidenziato un origine differenziativa diversa per le due sottoclassi di LDGCB ma, aspetto ancora più importante, hanno mostrato che queste diverse patologie rispondono con decorso clinico diverso al trattamento terapeutico standard (Rosenwald A. et al., 2002). In aggiunta agli studi chiave su LAM e LDGCB, la tecnologia dei microarray è stata utilizzata negli ultimi anni per lo studio di diversi tumori ematologici, come la leucemia linfocitica cronica (LCC), il linfoma a cellule del mantello, il linfoma del tessuto linfoide associato alla mucosa, il linfoma di Hodgkin e altre forme di leucemia e di linfoma (Ebert B.L. e Golub T.R., 2004).

Nell'ambito dei tumori solidi, grande attenzione è stata rivolta al carcinoma mammario, ed alla possibilità di identificare classi molecolari specifiche distintive per questo tipo di tumore. Numerosi studi di microarray

hanno, infatti, dimostrato che il carcinoma mammario può essere classificato in gruppi principali distinti in base a profili distintivi di espressione genica: i) il sottogruppo assimilabile a cellule basali, che è prevalentemente negativo per l'espressione del recettore dell'estrogeno (ER), negativo per il recettore del progesterone (PR) e negativo per ERBB2 (spesso identificato come triplo-negativo); ii) il sottotipo assimilabile a ERBB2, caratterizzato da un'espressione aumentata di diversi geni dell'amplicone ERBB2; iii) il sottotipo riconducibile a cellule luminali, prevalentemente positivo per ER, ed ulteriormente classificato in tre sottogruppi: luminale di tipo A, B e C (Sotiriou C. e Piccart M.J., 2007). Questa classificazione è stata successivamente suffragata da analisi di immunoistochimica di marcatori tumorali, e la prognosi associata ai diversi gruppi ha rilevato il decorso clinico più aggressivo dei tumori assimilabili a cellule basali o ER negativi, nonostante la migliore risposta a trattamenti chemioterapici, e una prognosi più favorevole per i tumori assimilabili a cellule luminali di tipo A, che risultano sensibili alla terapia endocrina (El-rehim D.M. et al., 2005, Sorlie T. et al., 2003). In realtà, uno degli aspetti più interessanti emersi da questi studi è stata la definizione di profili di espressione genica distintivi che hanno permesso di differenziare il carcinoma mammario e di definire una possibile origine del tumore da tipi cellulari diversi, al di là dell'espressione di ER, ERBB2 e del "tumor grade". Più recentemente, l'analisi di 78 tumori della mammella, effettuata mediante un array di 24,479 oligonucleotidi, ha portato all'identificazione di un profilo di espressione di 70 geni che ha permesso di classificare pazienti giovani (<55 anni) linfonodo-negative in due gruppi distinti: i) un primo gruppo caratterizzato da una prognosi buona (assenza di recidiva in 5 anni di follow-up); ii) un secondo gruppo destinato ad un prognosi cattiva (recidiva/ metastasi nell'arco di 5 anni di follow-up) (Van't Verr L.J. et al., 2002). Lo stesso set di 70 geni è stato successivamente utilizzato per un analisi più ampia estesa a un gruppo di 234 casi, includendo pazienti con cancro alla mammella allo stadio I e II indipendentemente dal coinvolgimento dei linfonodi. In questo studio, il profilo di espressione dei 70 geni ha superato i criteri di consenso NIH e St Gallen per il trattamento del tumore primario della mammella sia per i pazienti a basso che per quelli ad alto rischio (Van de Vijver M.J. et al., 2002). Nel complesso questi studi hanno chiaramente mostrato che nuove e più accurate classi diagnostiche del carcinoma mammario possono essere considerate, introducendo nella routine e pratica clinica tecniche genomiche combinate con valutazioni morfologiche e immunoistochimiche. A tutt'oggi, nonostante la classificazione molecolare non sia stata introdotta nella pratica clinica, la percezione dei medici e dei ricercatori nel definire la malattia e nel disegnare terapie risente delle informazioni generate da questi studi (studi rappresentativi in diverse tipologie di tumori sono indicati nella tabella 1). In prospettiva, la grande sfida degli studi di microarray in questa patologia

rimane l'identificazione di nuovi pathways molecolari coinvolti nello sviluppo e nella progressione della malattia, per lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative. Un esempio è dato dalla scoperta di un profilo di espressione genica distintivo associato all'attivazione del segnale del recettore dell'androgeno in un sottogruppo di carcinoma mammario ER- e PR-negativo, suggerendo la possibile introduzione, per queste pazienti, di terapie innovative che interferiscono con questo segnale (Doane A.S. et al., 2006). Infine, è importante sottolineare che le rapide implementazioni della tecnologia dei microarray e l'incontro di questa strategia con altri approcci metodologici come l'immunoistochimica e l'ibridazione *in situ*, forniranno

Tumore	**Applicazione**	**Referenza**
Carcinoma mammario	diagnosi/prognosi	Sotiriou C. et al., 2003
	efficacia terapeutica	Foekens J.A. et al., 2008
Leucemia	diagnosi	Kohlmann A.et al., 2008
	diagnosi	Alizadeh AA.et al., 2000
	prognosi	Rosenwald A. et al., 2002
	efficacia terapeutica	Ge Y. et al., 2008
Melanoma	prognosi	Winnepenninckx V. et al., 2006
	diagnosi	Talantov D. et al., 2005
	efficacia terapeutica	Critchley-Thorne R.J. et al., 2007
Epatocarcinoma	prognosi	Lee J.S. et al., 2004
	prognosi	Budhu A.S. et al., 2005
	efficacia terapeutica	Zhu X.D. et al., 2008
Neuroblastoma	prognosi	Chen Q.R. et al., 2008
	efficacia terapeutica	Schulte J.H. et al., 2003
Carcinoma renale	prognosi	Yao M. et al., 2008
	diagnosi/prognosi	Jones J., Pantuck A.J., 2008
	efficacia terapeutica	Pantuck A.J. et al., 2007
Carcinoma prostatico	prognosi	Zhang H. et al., 2008
	diagnosi	Fromont G. et al., 2008
	efficacia terapeutica	Lerner I. et al., 2008

Tabella 1. Selezione di studi di microarray in alcuni tipi di tumore.

a breve altri strumenti, come il "tissue microarray" (TMA) che permette un analisi rapida di marcatori tumorali in migliaia di campioni clinici, anche conservati in paraffina, con grandi potenzialità per l'analisi di marcatori tumorali, lo sviluppo di saggi diagnostici e lo studio della biologia tumorale (Voduc D. et al., 2008).

Predizione della risposta terapeutica in pazienti oncologici mediante l'uso di microarray: basi e prospettive della "medicina personalizzata"

Per anni, i trattamenti terapeutici convenzionali per pazienti oncologici sono stati basati sulla somministrazione di farmaci ad attività citotossica, selezionati in modo più o meno specifico rispetto all'organo o al tessuto di origine del tumore. Come detto precedentemente, l'analisi molecolare dei tumori ha reso evidente che lo stesso tipo di tumore può presentare alterazioni genetiche dissimili, che possono risultare in un diverso tipo di risposta alle terapie convenzionali da parte di individui diversi. Per questo motivo, nell'ultima decade si è avviato un processo mirato a sostituire trattamenti terapeutici convenzionali con terapie personalizzate, basate sui difetti genetici specifici rilevati nel tumore del singolo paziente. Questo approccio, identificato come "medicina personalizzata", richiede la scoperta di marcatori biologici prognostici, che danno indicazione sulla necessità di effettuare una terapia, e marcatori biologici predittivi, in base ai quali è possibile stabilire quale terapia ha più probabilità di essere efficace per un determinato paziente. Ad esempio, tali marcatori biologici possono indicare quando la resezione di un tumore primario possa risultare curativa senza la necessità di terapie adiuvanti oppure, in caso di tumori primari più maligni, quando sia necessario eseguire una terapia sistemica, per lo più chemioterapia, per ridurre il rischio di recidive.

Gli studi di microarray, sebbene in alcuni casi abbiano contribuito alla definizione di parametri predittivi della risposta a particolari terapie, non hanno ancora avuto riscontro come potenziale approccio sistematico in questo senso. E' stato, per esempio, osservato che profili di espressione genica non correlano perfettamente con la resistenza a determinate terapie, siano esse agenti chemioterapici convenzionali oppure le più nuove "terapie mirate" che dovrebbero essere indirizzate verso segnali molecolari più definiti. Una possibile spiegazione di questo fenomeno è che la resistenza alle terapie anticancro è un fenomeno complesso, prodotto di diversi meccanismi interconnessi, tra cui alcune mutazioni che non danno come effetto

grossi cambiamenti dell'espressione genica. A questo si unisce il fatto che, affinché l'associazione tra profili di espressione genica definiti e resistenza ad un particolare trattamento terapeutico sia significativa, l'analisi di microarray dovrebbe essere condotta su un numero di campioni tumorali sufficientemente grande, dell'ordine di centinaia. A causa di questi ed altri limiti, come la difficoltà nel reperire tutti i campioni bioptici necessari ad una classificazione fine del tumore in esame, come la biopsia prelevata prima del trattamento terapeutico in caso di tumori metastatici, sono stati pubblicati un numero ancora inadeguato di studi, per lo più non ancora validati, che associano specifici profili di espressione genica con la risposta a trattamenti terapeutici (Harris L.N. et al., 2007).

Conclusioni

L'intento della Food and Drug administration (FDA) americana di regolamentare i test diagnostici molecolari riflette l'impatto che queste tecnologie a breve potranno avere sul trattamento dei pazienti oncologici. Sebbene un limitato numero di profili di espressione genica sia attualmente disponibile per valutazioni cliniche, studi recenti finalizzati a valutare la variabilità inter-laboratorio di test basati sul DNA microarray per la prognosi del cancro della mammella hanno mostrato una concordanza estremamente alta tra i laboratori, a garanzia di una accettabile affidabilità di questi strumenti molecolari (Sotiriou C.e Piccart M.J., 2007, Ach R.A. et al., 2007). Su questa base, nella definizione di approcci integrati di diagnosi, prognosi e risposta ad agenti terapeutici, la grande sfida sarà valutare il contributo relativo degli aspetti clinici e della grande quantità di dati molecolari generati a diversi livelli. E' quindi di vitale importanza sviluppare modelli analitici in grado di combinare ed integrare parametri clinici e fattori molecolari complessi, come profili di espressione genica, proteomica funzionale, fattori di rischio definiti da approcci clinico-patologici tradizionali e parametri convenzionali di risposta a terapie (Pittman J. et al., 2004). Se la stretta collaborazione tra medici e scienziati permetterà di soddisfare queste attese si potrà finalmente arrivare alla tanto attesa rivoluzionaria medicina personalizzata. Naturale conseguenza di questo nuovo approccio sarà un probabile aumento dei costi, dovuto alle risorse impegnate e alla rigorosa standardizzazione delle procedure clinico-scientifiche. Tuttavia, non è difficile prevedere che a lungo raggio questo cambiamento è destinato a produrre un notevole risparmio economico, permettendo di abbandonare i sempre più costosi trattamenti

oncologici empirici nel caso in cui questi hanno alte probabilità di risultare inefficaci, e di impiegare terapie estremamente mirate. E' importante sottolineare, tuttavia, che il risparmio economico non deve essere il solo motore di questa "rivoluzione", e che ad agire come stimolo dovrebbero essere soprattutto l'obbligo morale verso i pazienti e la speranza di poter garantire loro l'accesso a terapie sempre piu' innovative ed efficaci (Piccart M.J. et al., 2007). Uno sforzo congiunto da parte di istituzioni, aziende farmaceutiche e compagnie assicurative sarebbe quindi auspicabile affinché questa impellente necessità sanitaria del ventunesimo secolo venga repecita e si inizi al più presto ad operare per promuovere il raggiungimento degli obiettivi che essa si prefigge.

Bibliografia

Abd El-Rehim D.M., Ball G., Pinder S.E., Rakha E., Paish C., Robertson J.F., Macmillan D., Blamey R.W., Ellis I.O.: High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. Int J Cancer 2005 Sep, VOL:116(3), P:340.

Ach R.A., Floore A., Curry B., Lazar V., Glas A.M., Pover R., Tsalenko A., Ripoche H., Cardoso F., d'Assignies M.S., Bruhn L., Van't Veer L.J.: Robust interlaboratory reproducibility of a gene expression signature measurement consistent with the needs of a new generation of diagnostic tools. BMC Genomics 2007 Jun, VOL: 8, P:148.

Alizadeh A.A., Eisen M.B., Davis R.E., Ma C., Lossos I.S., Rosenwald A., Boldrick J.C., Sabet H., Tran T., Yu X., Powell J.I., Yang L., Marti G.E., Moore T., Hudson J. Jr, Lu L., Lewis D.B., Tibshirani R., Sherlock G., Chan W.C., Greiner T.C., Weisenburger D.D., Armitage J.O., Warnke R., Levy R., Wilson W., Grever M.R., Byrd J.C., Botstein D., Brown P.O., Staudt L.M.: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 2000 Feb, VOL:403(6769), P:503.

Budhu A.S., Zipser B., Forgues M., Ye Q.H., Sun Z., Wang X.W.: The molecular signature of metastases of human hepatocellular carcinoma. Oncology 2005, VOL:69 (Suppl 1), P:23.

Bullinger L., Döhner K., Bair E., Fröhling S., Schlenk R.F., Tibshirani R., Döhner H., Pollack JR.: Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2004 Apr, VOL: 350(16), P:1605.

Chen Q.R., Song Y.K., Wei J.S., Bilke S., Asgharzadeh S., Seeger R.C., Khan J.: An integrated cross-platform prognosis study on neuroblastoma patients. Genomics 2008 Oct, VOL:92(4), P:195.

Chung C.H., Bernard P.S., Perou C.M.: Molecular portraits and the family tree of cancer. Nat Genet 2002 Dec, VOL:32 (Suppl), P:533.

Critchley-Thorne R.J., Yan N., Nacu S., Weber J., Holmes S.P., Lee P.P.: Down-regulation of the interferon signal.ing pathway in T lymphocytes from patients with metastatic melanoma. PLoS Med 2007 May, VOL:4(5): P:e176.

Doane A.S., Danso M., Lal P., Donaton M., Zhang L., Hudis C., Gerald W.L.: An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. Oncogene. 2006 Jun, VOL:25(28), P:3994.

Ebert B.L., Golub T.R.: Genomic approaches to hematologic malignancies. Blood 2004 Aug, VOL:104(4), P:923.

Foekens J.A., Wang Y., Martens J.W., Berns E.M., Klijn J.G.: The use of genomic tools for the molecular understanding of breast cancer and to guide personalized medicine. Drug Discov Today 2008 Jun, VOL:13(11-12), P:481.

Fromont G., Yacoub M., Valeri A., Mangin P., Vallancien G., Cancel-Tassin G., Cussenot O.: Differential. expression of genes related to androgen and estrogen metabolism in hereditary versus sporadic prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008 Jun, VOL:17(6), P:1505.

Ge Y., LaFiura K.M., Dombkowski A.A., Chen Q., Payton S.G., Buck S.A., Sal. agrama S., Diakiw A.E., Matherly L.H., Taub J.W.: The role of the proto-oncogene ETS2 in acute megakaryocytic leukemia biology and therapy. Leukemia. 2008 Mar, VOL:22(3), P:521.

Golub T.R., Slonim D.K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J.P., Coller H., Loh M.L., Downing J.R., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D., Lander E.S.: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 1999 Oct, VOL: 286(5439), P:531.

Gresham D., Dunham M.J., Botstein D.: Comparing whole genomes using DNA microarrays. Nat Rev Genet 2008 Apr, VOL:9(4), P:291.

Harris L.N., You F., Schnitt S.J., Witkiewicz A., Lu X., Sgroi D., Ryan P.D., Come S.E., Burstein H.J., Lesnikoski B.A., Kamma M., Friedman P.N., Gelman R., Iglehart J.D., Winer E.P.: Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. Clin Cancer Res 2007 Feb, VOL:13(4), P:1198.

Hoheisel J.D.: Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. Nat Rev Genet 2006 Mar, VOL:7(3), P:200.

Jansen M.P., Foekens J.A., van Staveren I.L., Dirkzwager-Kiel M.M., Ritstier K., Look M.P., Meijer-van Gelder M.E., Sieuwerts A.M., Portengen H., Dorssers L.C., Klijn J.G., Berns E.M.: Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling. J Clin Oncol 2005 Feb, VOL: 23(4), P:732.

Jones J., Pantuck A.J.: Genomics and proteomics in renal. cell carcinoma: diagnosis, prognosis, and treatment selection. Curr Urol Rep 2008 Jan, VOL:9(1), P:9.

Kohlmann A., Kipps T.J., Rassenti L.Z., Downing J.R., Shurtleff S.A., Mills K.I., Gilkes A.F., Hofmann W.K., Basso G., Dell'orto M.C., Foà R., Chiaretti S., De Vos J., Rauhut S., Papenhausen P.R., Hernández J.M., Lumbreras E., Yeoh A.E., Koay E.S., Li R., Liu W.M., Williams P.M., Wieczorek L., Haferlach T.: An international. standardization programme towards the application of gene expression profiling in routine leukaemia diagnostics: the Microarray Innovations in Leukemia study prephase. Br J Haematol 2008 Sep, VOL:142(5), P:802.

Lee J.S., Chu I.S., Heo J., Cal.visi D.F., Sun Z., Roskams T., Durnez A., Demetris A.J., Thorgeirsson S.S.: Classification and prediction of survival. in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. Hepatology 2004 Sep, VOL:40, P:667.

Lerner I., Baraz L., Pikarsky E., Meirovitz A., Edovitsky E., Peretz T., Vlodavsky I., Elkin M.: Function of heparanase in prostate tumorigenesis: potential. for therapy. Clin Cancer Res 2008 Feb 1, VOL:14(3), P:668.

Marincola F.M.: In support of descriptive studies; relevance to translational research. J Transl Med 2007 May, VOL:5, P:21.

Mazumder A., Wang Y.: Gene-expression signatures in oncology diagnostics. Pharmacogenomics 2006 Dec, VOL: 7(8), P:1167.

Pantuck A.J., Seligson D.B., Klatte T., Yu H., Leppert J.T., Moore L., O'Toole T., Gibbons J., Belldegrun A.S., Figlin R.A.: Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal. cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. Cancer 2007 Jun 1, VOL:109(11), P:2257.

Perou C.M., Sørlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S.X., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L., Brown P.O., Botstein D.: Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000 Aug, VOL:406(6797), P:747.

Piccart M., Goldhirsch A., Wood W., Pritchard K., Baselga J., Reaby L., Kössler I., Kyriakides S., Norton L., Coates A.: Keeping faith with trial volunteers. Nature. 2007 Mar, VOL:446(7132), P:137.

Pittman J., Huang E., Dressman H., Horng C.F., Cheng S.H., Tsou M.H., Chen C.M., Bild A., Iversen E.S., Huang A.T., Nevins J.R., West M.: Integrated

modeling of clinical and gene expression information for personalized prediction of disease outcomes. Proc Natl Acad Sci U S A 2004 Jun, VOL:101(22), P:8431.

Pusztai L.: Chips to bedside: incorporation of microarray data into clinical practice. Clin Cancer Res 2006 Dec, VOL: 12(24), P:7209.

Rosenwald A., Wright G., Chan W.C., Connors J.M., Campo E., Fisher R.I., Gascoyne R.D., Muller-Hermelink H.K., Smeland E.B., Giltnane J.M., Hurt E.M., Zhao H., Averett L., Yang L., Wilson W.H., Jaffe E.S., Simon R., Klausner R.D., Powell J., Duffey P.L., Longo D.L., Greiner T.C., Weisenburger D.D., Sanger W.G., Dave B.J., Lynch J.C., Vose J., Armitage J.O., Montserrat E., López-Guillermo A., Grogan T.M., Miller T.P., LeBlanc M., Ott G., Kvaloy S., Delabie J., Holte H., Krajci P., Stokke T., Staudt L.M.: Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med 2002 Jun, VOL:346(25), P:1937.

Ross M.E., Zhou X., Song G., Shurtleff S.A., Girtman K., Williams W.K., Liu H.C., Mahfouz R., Raimondi S.C., Lenny N., Patel A., Downing J.R.: Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. Blood 2003 Oct, VOL:102(8), P:2951.

Schulte J.H., Schramm A., Pressel T., Klein-Hitpass L., Kremens B., Eils J., Havers W., Eggert A.: Microarray-anal.ysis: a new approach to study the molecular mechanisms of thermo-chemotherapy. Klin Padiatr 2003 Nov-Dec, VOL:215(6), P:298.

Simon R., Lam A.P.: BRB-ArrayTools Users Guide (version 34). Bethesda, MD: Biometric Research Branch National Cancer Institute, 2005. Technical Report 46, hhtp:/linus.nci.nih.gov/brb.

Simon R.: Challenges of microarray data and the evaluation of gene expression profile signatures. Cancer Invest 2008 May, VOL:26(4), P:327.

Simon R.: Roadmap for developing and validating therapeutically relevant genomic classifiers. J Clin Oncol 2005 Oct, VOL: 23(29), P:7332.

Simon RM, Korn EL, McShane LM, Radmacher MD, Wright GW, Zhao Y.: Design and analysis of DNA microarray investigations. New York. Springer, 2003.

Sorlie T., Tibshirani R., Parker J., Hastie T., Marron J.S., Nobel A., Deng S., Johnsen H., Pesich R., Geisler S., Demeter J., Perou C.M., Lønning P.E., Brown P.O., Børresen-Dale A.L., Botstein D.: Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci U S A 2003 Jul, VOL:100(14), P:8418.

Sotiriou C., Neo S.Y., McShane L.M., Korn E.L., Long P.M., Jazaeri A., Martiat P., Fox S.B., Harris A.L., Liu E.T.: Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. Proc Natl Acad Sci U S A 2003 Sep, VOL:100(18), P:10393.

Sotiriou C., Piccart MJ.: Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care? Nat Rev Cancer 2007 Jul, VOL: 7(7), P:545.

Talantov D., Mazumder A., Yu J.X., Briggs T., Jiang Y., Backus J., Atkins D., Wang Y.: Novel genes associated with mal.ignant melanoma but not benign melanocytic lesions. Clin Cancer Res 2005 Oct, VOL:11(20), P:7234.

Trevino V., Falciani F., Barrera-Saldaña HA.: DNA microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research. Mol Med 2007 Sep-Oct, VOL:13(9-10), P:527.

Valk P.J., Verhaak R.G., Beijen M.A., Erpelinck C.A., Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S., Boer J.M., Beverloo H.B., Moorhouse M.J., van der Spek P.J., Löwenberg B., Delwel R.: Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. N Engl J Med 2004 Apr, VOL:350(16), P:1617.

van de Vijver M.J., He Y.D., van't Veer L.J., Dai H., Hart A.A., Voskuil D.W., Schreiber G.J., Peterse J.L., Roberts C., Marton M.J., Parrish M., Atsma D., Witteveen A., Glas A., Delahaye L., van der Velde T., Bartelink H., Rodenhuis S., Rutgers E.T., Friend S.H., Bernards R.: A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. N Engl J Med 2002 Dec, VOL:347(25), P:1999.

van 't Veer L.J., Dai H., van de Vijver M.J., He Y.D., Hart A.A., Mao M., Peterse H.L., van der Kooy K., Marton M.J., Witteveen A.T., Schreiber G.J., Kerkhoven R.M., Roberts C., Linsley P.S., Bernards R., Friend S.H.: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature. 2002 Jan, VOL: 415(6871), P:530.

van't Veer L.J., Bernards R.: Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. Nature 2008 Apr, VOL:452(7187), P:564.

Voduc D., Kenney C., Nielsen T.O.: Tissue microarrays in clinical oncology. Semin Radiat Oncol 2008 Apr, VOL:18(2), P:89.

Winnepenninckx V., Lazar V., Michiels S., Dessen P., Stas M., Al.onso S.R., Avril M.F., Ortiz Romero P.L., Robert T., Bal.acescu O., Eggermont A.M., Lenoir G., Sarasin A., Tursz T., van den Oord J.J., Spatz A.: Melanoma Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer.Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical. outcome. J Natl Cancer Inst 2006 Apr 5, VOL:98(7), P:472.

Yang S.X., Simon R.M., Tan A.R., Nguyen D., Swain S.M.: Gene expression patterns and profile changes pre- and post-erlotinib treatment in patients with metastatic breast cancer. Clin Cancer Res 2005 Sep, VOL:11(17), P:6226.

Yao M., Huang Y., Shioi K., Hattori K., Murakami T., Sano F., Baba M., Kondo K., Nakaigawa N., Kishida T., Nagashima Y., Yamada-Okabe H., Kubota Y.: A three-gene expression signature model to predict clinical. outcome of clear cell renal. carcinoma. Int J Cancer 2008 Sep, VOL:123(5), P:1126.

Zhang X., Zhang H., Tighiouart M., Lee J.E., Shin H.J., Khuri F.R., Yang C.S., Chen Z.G., Shin DM.: TIP30 is associated with progression and metastasis of prostate cancer. Int J Cancer 2008 Aug, VOL:123(4), P:810.

Zhu X.D., Zhang J.B., Zhuang P.Y., Zhu H.G., Zhang W., Xiong Y.Q., Wu W.Z., Wang L., Tang Z.Y., Sun H.C.: High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral. liver tissue is associated with poor survival. after curative resection of hepatocellular carcinoma. J Clin Oncol 2008 Jun, VOL:26(16), P:2707.

Studio di tumori pediatrici rari attraverso l'impiego di cDNA microarray

Marco Salvatore[1], Mara Viganotti[1], Stefano Lorenzetti[2]
[1]*Centro Nazionale Malattie Rare,* [2]*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Tumori pediatrici rari

In confronto alla popolazione adulta, i tumori maligni dell'infanzia sono relativamente poco comuni: infatti su un totale di 100 nuovi casi di tumore, solo 1 è un tumore pediatrico (Ferrari A. et al., 2007) [1].

Negli Stati Uniti d'America (USA), l'incidenza annuale dei tumori pediatrici rari è di 1 ogni 7.000 bambini e ogni anno vengono identificati circa 12.000 nuovi casi di tumori rari (Gurney J.G. e Bondy M.L., 2006, Ries L.A.G. et al. 1999).

In Europa, considerando i registri di 19 diversi Paesi, ogni anno circa un bambino su 600 sviluppa un tumore (incidenza annuale pari a 0.016%) (Steliarova-Foucher E. et al., 2004). Sia in Europa che negli USA la predominanza è di tipo maschile (Ries L.A.G. et al. 1999, Steliarova-Foucher E. et al., 2004).

In Europa, una malattia è definita "rara" quando, secondo la definizione adottata dall'Unione Europea (UE), ha una prevalenza non superiore a 5 casi ogni 10.000 abitanti (A Community action programme on RD, 1999 - 2003); tuttavia, questa misura epidemiologica non è molto appropriata nel caso dei tumori "rari" e viene pertanto proposto l'utilizzo dell'incidenza.

I tumori pediatrici rari sono estremamente eterogenei e caratterizzati da un'estrema variabilità sia da un punto di vista biologico che clinico (Steliarova-Foucher E. et al., 2004, Voute P.A., 2005).

Negli ultimi anni, sono stati sviluppati e messi a punto diversi approcci multidisciplinari, spesso basati sull'integrazione di metodologie classiche ed altre più innovative (caratterizzazione genetica e citogenetica associata ad analisi dei profili di espressione genica, dei microRNA, e delle proteine, studio delle modificazioni epigenetiche, etc.). Ad esempio, la caratterizzazione dei profili di espressione genica si è rivelato un importante strumento di indagine per fornire informazioni sui meccanismi d'azione e sui bersagli molecolari coinvolti nell'oncogenesi di molte forme tumorali. In particolare, la tecnologia basata sui cDNA microarray consente di analizzare e confron-

1 L'età pediatrica è compresa tra 0 e 14 anni.

tare i profili di espressione genica delle cellule tumorali con quelle normali in maniera tessuto-specifico. L'applicazione dell' analisi dei profili di espressione genica è, comunque, limitata dalla disponibilità di campioni tissutali prelevati dai pazienti (siano essi tessuti freschi o conservati in paraffina). Tale limitazione è ancora più marcata dalle basse incidenze dei tumori rari pediatrici in cui la rarità della malattia diventa anche una limitazione alla ricerca di base.

Tuttavia, l'impiego dei cDNA microarray sta trovando ampio spazio anche e soprattutto nello studio di quei tumori pediatrici rari senza una diagnosi definitiva. In questo ambito, infatti, la limitatezza di campioni biologici, unitamente alle non esaustive informazioni ottenibili con le metodologie più classiche (ad esempio le analisi istopatologiche) non sempre portano ad una diagnosi definitiva. Lo studio dei profili di espressione genica di questi tumori tramite cDNA micro-array sicuramente costituisce un approccio utile per ottenere maggiori informazioni circa l'origine del tumore e può contribuire così alla sua definizione clinica nonché al suo trattamento.

Applicazione dei cDNA microarray ai tumori pediatrici rari

L'analisi del profilo di espressione genica mediante cDNA microarray fornisce un quadro generale dei processi molecolari caratteristici di un particolare campione cellulare in un determinato "momento" fisio-patologico, poiché permette lo studio di migliaia di geni in maniera simultanea attraverso un singolo esperimento (Abdullah-Sayani A. et al., 2006). Rispetto agli studi tradizionali di genetica umana, incentrati sullo studio intensivo di uno o pochi geni, tale approccio rappresenta un significativo passo in avanti. Nel campo della oncologia pediatrica, i metodi classici utilizzati per la classificazione dei tipi cellulari tumorali sono basati sull'analisi della morfologia cellulare e su un numero ristretto di marcatori genetici e/o di anomalie citogenetiche. Per quanto utili, questi tipi di approcci non sono comunque sempre in grado di distinguere diversi tipi di cellule tumorali e non possono essere sempre utilizzati nella identificazione di specifici riarrangiamenti cromosomici.

Alcuni esempi:

Ematologia/leucemie. La leucemia acuta linfoblastica (Acute Lymphoblastic Leucemia, ALL) rappresenta la forma più comune di leucemia infantile con

circa 4.000 nuovi casi diagnosticati ogni anno. La sopravvivenza a questa forma di tumore è aumentata negli ultimi 40 anni (approssimativamente dal 15 all'80%) (Gaynon P. S. et al., 1997, Holleman A. et al., 2004), sebbene l'estrema eterogeneità della malattia è testimoniata dalle diverse risposte ai trattamenti farmacologici, a volte fallimentari, a volte con la manifestazione di gravi effetti collaterali. La capacità di identificare e classificare specifiche classi e sottoclassi di tumori attraverso l'impiego dei profili di espressione genica consentirebbe, quindi, lo sviluppo di terapie più specifiche e mirate (Liang D.C. et al., 2005, Cario G. et al., 2005, Hessner M.J. et al., 2006). A testimonianza di ciò, l'applicazione della tecnologia dei microarray e dei profili di espressione genica in una serie di studi sulla leucemia acuta linfoblatica e di leucemia mieloide acuta, ha consentito la caratterizzazione in diverse sottoclassi delle due malattie leucemiche permettendo così un'accurata distinzione delle classi tumorali finalizzata ad una specifica diagnosi clinica (Moos P.J. et al., 2002, Ross M.E. et al., 2003, Yeoh E.J. et al., 2002). Le leucemie infantili sono tradizionalmente classificate sulla base delle caratteristiche cliniche e biologiche correlate con la prognosi (Crist W. et al., 1986, Pui C. H. e Crist W.,1994, Smith M. et al., 1996). I criteri universalmente accettati per la classificazione delle leucemie sono l'età e la conta dei globuli bianchi al momento della diagnosi (Smith M. et al., 1996); altri parametri utilizzati sono la rapidità nella risposta alla terapia e le anomalie cromosomiche che includono sia alterazioni nel numero dei cromosomi (ploidia) (Heerema N. et al., 1999, Ito C. et al., 1999, Trueworthy R. et al., 1992) che della loro struttura (traslocazioni) (Williams D. L. et al., 1986). Malgrado la riconosciuta importanza prognostica di questi criteri, la persistente variabilità nel decorso clinico dei singoli pazienti suggerisce l'esistenza di leucemie caratterizzate da diversi profili genetici (Xu F. et al., 1999, Tartaglia M. et al. 2005, Carroll W.L. et al., 2006). Mediante cDNA microarray ad alta densità, infatti, è stato possibile individuare sia il set di geni capaci di discriminare tra i vari sottotipi di leucemie sia di mettere in evidenza la diversità che caratterizza i singoli pazienti anche all'interno dello stesso sottogruppo (Moos P.J. et al., 2002). Inoltre, anche la risposta al trattamento farmacologico e la resistenza alla chemioterapia (che risultano soggettive tra diversi pazienti) può essere evidenziata mediante profili di espressione genica: per esempio, lo studio dell'espressione genica in 441 pazienti affetti da leucemia acuta linfoblastica ha permesso l'individuazione di un set di 45 geni diversamente espressi che sono nel loro insieme capaci di costituire una "signature" per la resistenza a diversi chemioterapici, quali prednisolone, vincristina, asparaginasi e daunorubicina, e allo stesso tempo un sottogruppo dei suddetti 45 geni è in grado di discriminare la diversa risposta ai trattamenti (Lilleyman J. S., 1998, Lugthart S. et al., 2005).

Rabdomiosarcoma alveolare e epatoblastoma.

Oltre all'impiego dell'applicazione dei cDNA microarray nella classificazione in classi e sottotipi tumorali, l'analisi dei profili di espressione genica può facilitare la comprensione delle basi molecolari di tumori rari pediatrici (Stevens M.C., 2005). Ad esempio, nuove informazioni sui meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza del Rabdomiosarcoma Alveolare (RA) sono state ottenute alcuni anni fa' attraverso l'impiego proprio dei cDNA microarrays (Douglass E. C. et al., 1991, Klein U. e Dalla-Favera R., 2008). Il RA, sottotipo della più vasta famiglia dei rabdomiosarcomi che interessano la muscolatura scheletrica striata, è un tumore infantile caratterizzato da scarsa diagnosi e difficile classificazione. Negli USA, ogni anno si stimano circa 350 nuovi casi di RA, in maggioranza diagnosticati in bambini con meno di 6 anni di età. La ratio maschio-femmina è stimata intorno a 1.4:1. Lo studio dei profili d'espressione è stato facilitato dalla relativa uniformità genetica che caratterizza questo tipo di tumore (Khan J. et al.,1998, Miller L.D. et al., 2002): circa il 70% degli individui affetti da RA, infatti, presenta la traslocazione t(2;13)(q35-37; q14), sebbene altri studi riportino diversi casi di traslocazione t(1;13)(p36;q14). Queste traslocazioni sono caratterizzate dalla formazione di nuovi fattori di trascrizione che coinvolgono il gene FKHR e alcuni geni PAX, PAX7, PAX3; (Klein U. e Dalla-Favera R., 2008). L'utilizzo di cDNA microarray a bassa densità [1238 cloni di cDNA; (Golub T.R. et al., 1999)] ha permesso l'identificazione dei geni modulati dai fattori di trascrizione ottenuti dalle traslocazioni suddette, evidenziando così un pattern di espressione comune in RA che comprende geni legati allo stato di differenziamento della cellula tumorale progenitrice (ad es. il gene MYL4), geni coinvolti nelle aberrazioni cromosomiche che contribuiscono alla progressione tumorale (ad es. il gene FKHR stesso) e geni che codificano per proteine che stimolano la proliferazione cellulare (ad es. il gene CDK4).

Anche la caratterizzazione e distinzione di rari tumori epatici ha tratto vantaggio dall'impiego dei profili di espressione genica. I tumori epatici sono tra i tumori più diffusi in età pediatrica e rappresentano la terza causa di morte per cancro. La loro incidenza media è di circa 710.000 nuovi casi all'anno: a causa della loro aggressività, il tasso di mortalità ad essi correlato è pressoché identico alla loro incidenza (circa 680.000 casi all'anno) (Douglass E. C. et al., 1991). L'epatoblastoma (HB) è il tumore pediatrico del fegato più comune ed è osservato principalmente in bambini di età inferiore ai 3 anni. L'eziologia dell'HB rimane tutt'oggi sconosciuta: la maggior parte dei casi di HB sono sporadici e associati a predisposizione genetiche – deregolazioni delle vie metaboliche Wnt/β-catenina come nella poliposi adenomatosa familiare (FAP) e IGF-2 come nella sindrome di Beckwith-Wiedemann (BWS) – e a fattori ambientali e/o legati allo stile di vita poichè i casi di HB associati

a nascita prematura e basso peso alla nascita negli ultimi anni sono in netto aumento (DeBaun M.R. e Tucker M.A.,1998, Hughes L.J. e Michels V.V., 1992, Parkin D.M. et al., 1993). Sebbene siano state riportate numerose evidenze riguardanti alterazioni citogenetiche e molecolari – quali la perdita di eterozigosità nel locus 11p15 (in cui risiede il gene IGF-2) e mutazioni dei geni APC e β-catenina (entrambi coinvolti nel pathway di Wnt/β-catenina) (Ikeda H. et al., 1997) – gli eventi molecolari alla base di questo tumore non sono ancora ben definiti e, soprattutto, non consentono di distinguere chiaramente HB dai tumori epatici dell'adulto. Al fine di identificare i geni differenzialmente espressi in HB (in comparazione a tessuto epatico sano), l'analisi dei profili di espressione genica di tessuti tumorali di HB è stata effettuata su cDNA microarray ad alta densità (Albrecht S. et al., 1994). Tale studio ha permesso l'identificazione di alterazioni dell'espressione genica di 26 geni coinvolti nella divisione cellulare e nella crescita tumorale (tra cui 2 geni dell'asse IGF quali IGF-2 e IGFBP-4): secondo gli autori quattro di questi geni, che mappano nella regione cromosomica 1q21-q32, sembrano possedere un buon potere predittivo nell'identificazione del tumore HB.

Inoltre, lo studio dei profili d'espressione mediante cDNA microarray a bassa densità (circa 1000 geni) di linee cellulari epatiche (Nagata T. et al., 2003) ottenute da diversi tessuti non tumorali e tumorali di HB e epatocarcinoma (HCC), ha permesso di distinguere tali linee cellulari in base all'espressione o meno della α-fetoproteina (AFP). La AFP è una glicoproteina espressa dal sacco del tuorlo fetale e dal fegato la cui espressione è repressa immediatamente dopo la nascita. Solo in condizioni tumorali l'espressione della AFP viene riattivata: ciò avviene sia nelle linee cellulari di HB che di HCC. Nelle cellule esprimenti AFP è stata osservata la modulazione significativa di 18 geni coinvolti nella cancerogenesi epatica: tale correlazione tra livelli di espressione di AFP (noto marcatore tumorale epatico) e la modulazione di uno specifico set di geni permette quindi di definire il profilo di espressione genica in funzione dell'alterazione fisio-patologica.

Limiti della tecnologia dei microarray applicata ai tumori pediatrici rari

Affinchè l'impiego dei profili di espressione genica nello studio dei tumori pediatrici rari possa diventare uno strumento clinico di diagnosi, devono ancora essere risolti innumerevoli problemi riguardanti l'affidabilità e la riproducibilità dei protocolli sperimentali (Hessner M.J. et al., 2006).

Lo studio del profilo di espressione genica applicato alle malattie umane è estremamente complesso sia per la natura altamente sofisticata della tecnologia del cDNA microarray combinata con la gestione della grande quantità di dati raccolti che è spesso causa di errori (Kawai H.F. et al.,2001), sia perchè richiede la collaborazione di diverse figure professionali quali chirurghi, patologi, biologi molecolari e bioinformatici (Miller L.D. et al., 2002, Tu I.P. et al., 2004). Inoltre, non esiste un protocollo sperimentale di riferimento per cui l'esecuzione dei diversi passaggi sperimentali varia in ogni studio. E' evidente, quindi, che per risolvere il problema dell'affidabilità e riproducibilità dei risultati bisogna innanzitutto eseguire degli esperimenti sottoposti a rigidi controlli di qualità (Van't Veer L.J. e De Jong D., 2002).

In particolare, il problema principale connesso allo studio dei tumori pediatrici rari attraverso l'impiego di cDNA microarray è legato alla limitatezza dei campioni da esaminare. L'impiego di campioni di tessuto fresco congelato sarebbe indispensabile al fine di assicurare che la qualità dell'RNA, che da essi viene estratto, sia ottimale. Tuttavia, non sempre tali campioni biologici sono disponibili in quanto nella maggior parte degli ospedali in cui questi tessuti vengono prelevati, essi sono fissati in formalina ed inclusi in paraffina. Queste metodiche di fissazione e conservazione portano ad una considerevole degradazione di RNA (Forster T. et al., 2003). Di conseguenza, i campioni tissutali conservati in paraffina non risultano completamente affidabili nella ricerca di nuove espressioni geniche, sebbene possano essere impiegati nella validazione di nuovi profili di espressione per i quali geni differenzialmente espressi sono già stati identificati.

Altro fattore spesso limitante nello studio di tumori pediatrici rari attraverso cDNA microarray è la mancanza di standard nell'esecuzione delle varie fasi del processo, che causa la grande variabilità inter-esperimento che ha finora impedito l'impiego dei microarray anche nella pratica diagnostica (Paik S. et al., 2005). L'individuazione di nuovi profili di espressione genica dipende dalla numerosità dei campioni da esaminare: il valore prognostico attribuito a risultati pubblicati su cDNA microarray dovrebbe essere quindi considerato con molta cautela. In un recente lavoro di meta-analisi, sono stati riesaminati i risultati di 7 grandi ed importanti pubblicazioni il cui scopo era la predizione della prognosi di tumori in pazienti sulla base di risultati ottenuti mediante impiego di cDNA microarray. I risultati ottenuti da questa meta-analisi hanno dimostrato che la lista dei geni precedentemente identificati e classificati come predittori di prognosi era altamente instabile e dipendente dal numero di pazienti utilizzati nel mettere a punto le condizioni di base dell'esperimento. Per tutti gli studi riesaminati, eccetto uno, la proporzione dei pazienti erroneamente classificati diminuiva all'aumentare del numero dei pazienti inclusi nell'analisi. Gli studi selezionati e riesaminati sono

pertanto risultati troppo ottimistici a causa di una inadeguata validazione delle condizioni di partenza: in tale meta-analisi, infatti, la conclusione degli autori è stata che in 5 studi su 7 la classificazione effettuata risultava essere casuale (Pusztai L. e Hess K.R., 2004)

Il ruolo della validazione dei dati attraverso l'analisi di un numero di campioni sufficientemente ampio rappresenta quindi il fattore limitante dell'approccio allo studio dei tumori pediatrici rari. Tale limitazione fa' si che i risultati che si ottengono da pochi campioni non sia statisticamente valido e quindi rappresentino più un risultato qualitativo che quantitativo. Studi condotti su migliaia di campioni tissutali permettono infatti di tener conto delle innumerevoli variabilità biologiche dei pazienti donatori (Michiels S. et al., 2005) consentendo una maggiore attendibilità dei dati ottenuti sia dal punto di vista della significatività statistica che della applicabilità clinica (Ntzani E.E. e Ioannidis J.P., 2003, Ramaswamy S. e Golub T.R., 2002).

Bibliografia

Abdullah-Sayani A., Bueno-de-Mesquita J.M., van de Vijver M.J.: Technology Insight: tuning into the genetic orchestra using microarrays—limitations of DNA microarrays in clinical practice. Nature Clinical Practice Oncology 2006 Sep, VOL: 9(3), P: 501.

Albrecht S., von Schweinitz D., Waha A., Kraus J.A., von Deimling A., Pietsch T.: Loss of maternal alleles on chromosome arm 11p in hepatoblastoma. Cancer Res 1994 Oct, VOL: 54(19), P: 5041.

Cario G., Stanulla M., Fine B.M., Teuffel O., Neuhoff N.V., Schrauder A., Flohr T., Schäfer B.W., Bartram C.R., Welte K., Schlegelberger B., Schrappe M.: Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2005 Jan Vol:105 (2), P:821.

Carroll W.L., Bhojwani D., Min D.J., Moskowitz N., Raetz E.A.: Childhood acute lymphoblastic leukemia in the age of genomics. Pediatr Blood Cancer 2006 May, VOL: 46(5), P: 570.

Crist W., Boyett J., Pullen, J., van Eys J., Vietti T.: Clinical and biologic features predict poor prognosis in acute lymphoid leukemias in children and adolescents: a Pediatric Oncology Group review. Med. Pediatr. Oncol., 1986 VOL: 14(3), P: 135.

DeBaun M.R., Tucker M.A.: Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith–Wiedemann Syndrome Registry. J Pediatr 1998 Mar VOL: 132 (3 Pt1), P: 398.

Douglass E. C., Valentine M., Etcubanas E., Parham D., Webber B. L., Houghton. P. J., Houghton, J. A., Green, A. A.: A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma. Cytogenet Cell Genet 1987, VOL: 45(3-4), P: 148.

Douglass E. C., Rowe S. T., Valentine M., Parham D. M., Berkow R., Bowman W. P., Maurer H. M.: Variant translocations of chromosome 13 in alveolar rhabdomyosarcoma. Genes Chromosomes Cancer 1991 Nov, VOL: 3 (6), P: 480.

Ferrari A., Bisogno G., De Salvo G.L., Indolfi P., Perilongo G., Cecchetto G.: Italian Study on Rare Tumours in Paediatric Age (TREP); Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica (AIEOP). The challenge of very rare tumours in childhood: the Italian TREP project. Eur J Cancer. 2007 Mar, VOL: 43 (4), P:654.

Forster T., Roy D., Ghazal P.: Experiments using microarray technology: limitations and standard operating procedures. J Endocrinol 2003 Aug, VOL: 178 (2), P: 195.

Gaynon P. S., Desai A. A., Bostrom B. C., Hutchinson R. J., Lange B. J., Nachman J. B., Reaman G. H., Sather H. N., Steinherz P. G., Trigg M. E., Tubergen D. G., Uckun, F. M.: Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: a review. Cancer (Phila.) 1997 Nov, VOL: 80(9), P: 1717.

Golub T.R., Slonim D.K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J.P., Coller H., Loh M.L., Downing J.R., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D., Lander E.S.: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 1999 Oct, VOL: 286 (5439), P:531.

Gurney J.G., Bondy M.L. Epidemiology of childhood cancer. In: Pizzo PA, Poplack DG (Eds). Principles and practice of pediatric oncology. Fifth ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006, P: 1–13.

Heerema N., Nachman J., Sather H., Sensel, M., Lee M., Hutchinson R., Lange B., Steinherz P., Bostrom B., Gaynon P., Arthur D., Uckun F.: Hypodiploidy with 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. Blood 1999 Dec, VOL: 94 (12), P: 4036.

Hessner M.J., Liang M., Kwitek A.E.: The application of microarray analysis to pediatric diseases. Pediatr Clin North Am 2006 Aug, VOL:53(4), P:579.

Holleman A., Cheok M.H., den Boer M.L., Yang W., Veerman A.J., Kazemier K.M., Pei D., Cheng C., Pui C.H., Relling M.V., Janka-Schaub G.E., Pieters R., Evans W.E.: Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. N Engl J Med 2004 Aug, VOL: 351(6), P: 533.

Hughes L.J., Michels V.V.: Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis. Am J Med Genet 1992 Aug VOL: 43 (6), P: 1023.

Ikeda H., Matsuyama S., Tanimura M. Association between hepatoblastoma and very low birth weight: a trend or a chance? J Pediatr 1997 Apr, VOL: 130 (4), P: 557.

Ito C., Kumagai M., Manabe A., Coustan-Smith E., Raimondi S. C., Behm F. G., Murti G., Rubnitz J. E., Pui C-H., and Campana D.: Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 to 65 chromosomes: a distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. Blood 1999 Jan, VOL: 93(1), P: 315.

Kawai H.F., Kaneko S., Honda M., Shirota Y., Kobayashi K.: a-Fetoprotein–Producing Hepatoma Cell Lines Share Common expression Profiles of Genes in Various Categories Demonstrated by cDNA Microarray Analysis. Hepatology 2001 Apr, VOL: 33(4), P: 666.

Khan J., Simon R., Bittner M., Chen Y., Leighton S.B., Pohida T., Smith P.D., Jiang Y., Gooden G.C., Trent J.M., Meltzer P.S.: Gene expression profiling of alveolar rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays Cancer Res. 1998 Nov, VOL: 58(22), P:5009.

Klein U., Dalla-Favera R.: Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. Nat Rev Immunol. 2008 Jan, Vol:8(1), P:22.

Liang D.C., Shih L.Y., Huang C.F., Hung I.J., Yang C.P., Liu H.C., Jaing T.H., Wang L.Y., Chang W.H.: CEBPalpha mutations in childhood acute myeloid leukemia.Leukemia. 2005 Mar; VOL:19(3), P:410.

Lilleyman J. S.: Clinical importance of speed of response to therapy in childhood lymphoblastic leukaemia. Leuk Lymphoma 1998 Nov, VOL: 31(5-6), P: 501.

Lugthart S., Cheok M.H., den Boer M.L., Yang W., Holleman A., Cheng C., Pui C.H., Relling M.V., Janka-Schaub G.E., Pieters R., Evans W.E.: Identification of genes associated with chemotherapy cross-resistance and treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Cell 2005 Apr, Vol:7(4), P: 375.

Michiels S., Koscielny S., Hill C.: Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. Lancet 2005 Feb, VOL: 365 (9458), P: 488.

Miller L.D., Long P.M., Wong L., Mukherjee S., McShane L.M., Liu E.T.: Optimal gene expression analysis by microarrays. Cancer Cell 2002 Nov, VOL: 2(5), P: 353.

Moos P.J., Raetz E.A., Carlson M.A., Szabo A, Smith F.E., Willman C., Wei Q., Hunger S.P., Carroll W.L.: Identification of gene expression profiles that segregate patients with childhood leukemia. Clin Cancer Res 2002 Oct, VOL : 8(10), P :3118.

Nagata T., Takahashi Y., Ishii Y., Asai S., Nishida Y., Murata A., Koshinaga T., Fukuzawa M., Hamazaki M., Asami K., Ito E., Ikeda H., Takamatsu H., Koike K., Kikuta A., Kuroiwa M., Watanabe A., Kosaka Y., Fujita H., Miyake M., Mugishima H.: Transcriptional profiling in hepatoblastomas using high-density oligonucleotide DNA array. Cancer Genetic and Cytogenetic 2003 Sep, VOL: 145(2), P:152.

Ntzani E.E., Ioannidis J.P.: Predictive ability of DNA microarrays for cancer outcomes and correlates: an empirical assessment. Lancet 2003 Nov, VOL: 362(9394), P: 1439.

Parkin D.M., Ohshima H., Srivatanakul P., Vatanasapt V.: Cholangiocarcinoma: epidemiology, mechanisms of carcinogenesis and prevention. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1993 Nov-Dec, VOL: 2(6), P: 537.

Paik S., Kim C.Y., Song Y.K., Kim W.S.: Technology insight: application of molecular techniques to formalin-fixed paraffin-embedded tissues from breast cancer. Nat Clin Pract Oncol 2005 May, Vol:2(5), P: 246.

Pui C. H., Crist W.: M. Biology and treatment of acutelymphoblastic leukemia J. Pediatr 1994 Apr, VOL: 124(4), P: 491.

Pusztai L., Hess K.R.: Clinical trial design for microarray predictive marker discovery and assessment. Ann Oncol 2004 Dec, VOL: 15(12), P: 1731.

Ramaswamy S., Golub T.R.: DNA microarrays in clinical oncology. J Clin Oncol 2002 Apr, VOL: 20 (7), P: 1932.

Ries L.A.G., Smith M.A., Gurney J.G., et al, (Eds). Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975–1995. Bethesda (MD): National Cancer Institute, SEER Program 1999. NIH Pub. No. 99–4649.

Ross M.E., Zhou X., Song G., Shurtleff S.A., Girtman K, Williams W.K., Liu H.C., Mahfouz R., Raimondi S.C., Lenny N., Patel A., Downing J.R.: Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. Blood 2003 Oct, VOL: 102(8), P:2951.

Smith M., Arthur D., Camitta B., Carroll A. J., Crist W., Gaynon P., Gelber R., Heerema N., Korn E. L., Link M., Murphy S., Pui C. H., Pullen J., Reamon G., Sallan S. E., Sather H., Shuster J., Simon R., Trigg M., Tubergen D., Uckun F., Ungerleider R.: Uniform approach to risk classification and treatment assignment forchildren with acute lymphoblastic leukaemia. J. Clin. Oncol 1996 Jan, VOL: 14(1), P: 18.

Steliarova-Foucher E., Stiller C., Kaatsch P., Kaatsch P., Berrino F., Coebergh J.W., Lacour B., Parkin M.: Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since the 1970s (the ACCIS project): an epidemiological study. Lancet 2004 Dec, VOL: 364 (9451), P: 2097.

Stevens M.C.: Treatment for childhood rhabdomyosarcoma: the cost of cure. Lancet Oncol. 2005 Feb, VOL: 6 (2), P: 77.

Tartaglia M., Martinelli S., Iavarone I., Cazzaniga G., Spinelli M., Giarin E., Petrangeli V., Carta C., Masetti R., Aricò M., Locatelli F., Basso G., Sorcini M., Pession A., Biondi A. Somatic PTPN11 mutations in childhood acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2005 May, VOL:129 (3), P:333.

Trueworthy R., Shuster J., Look T., Crist, W., Borowitz M., Carroll A., Frankel L., Harris M., Wagner H., Haggard M., Mosijczuk A., Pullen J., Steuber P., Land V.: Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. J. Clin. Oncol 1992 Apr, VOL: 10 (4), P: 606.

Tu I.P., Schaner M., Diehn M., Sikic B.I., Brown P.O., Botstein D., Fero M.J. A method for detecting and correcting feature misidentification on expression microarrays. BMC Genomics 2004 Sep, VOL: 5 (1), P: 64.

Van't Veer L.J., De Jong D.: The microarray way to tailored cancer treatment. Nat Med 2002, VOL:8(1), P: 13.

Voute P.A. Cancer in Children: Clinical Management (5th ed). (Eds) Oxford University Press, 2005.

Williams D. L., Harber J., Murphy S. B., Look A. T., Kalwinsky D. K., Rivera G., Melvin S. L., Stass, S., Dahl, G. V.: Chromosomal translocations play a unique role in influencing prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood, 1986 Jul, VOL: 68 (1), P: 205.

Xu F., Taki T., Yang H.W., Hanada R., Hongo T., Ohnishi H., Kobayashi M., Bessho F., Yanagisawa M., Hayashi Y.: Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. Br J Haematol 1999 Apr, VOL: 105(1), P:155.

Yeoh E.J., Ross M.E., Shurtleff S.A., Williams W.K., Patel D., Mahfouz R., Behm F.G., Raimondi S.C., Relling M.V., Patel A., Cheng C., Campana D., Wilkins D., Zhou X., Li J., Liu H., Pui C.H., Evans W.E., Naeve C., Wong L., Downing J.R. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. Cancer Cell 2002 Mar, VOL:1(2), P:133.

Microarray e celiachia

Camillo Di Tommaso[1], Mariano Magrì[2], Armando Capanna[3], Panfilo Cantelmi[4], Paola Tataseo[5], Germano Gerosolimo[5], Yvonne D'Alesio[6], Alessia Di Fonso[5], Flavio Rispoli[1], Cinzia Bascietto[7], Cinzia Marcantonio[8], Leonardo Geraci[5] e Francesco Bascietto[2]

[1]ASL Avezzano-Sulmona, Ospedale Civile di Sulmona- Divisione di Medicina Generale; [2]ASL Avezzano-Sulmona, Ospedale Civile di Sulmona- Divisione di Pediatria; [3]ASL Avezzano-Sulmona, Ospedale Civile di Sulmona- Divisione di Endoscopia Digestiva; [4]ASL Avezzano-Sulmona, Ospedale Civile di Sulmona- Laboratorio Analisi; [5]ASL Avezzano-Sulmona, Ospedale Civile di Sulmona, Centro di Riferimento per lo studio ed il monitoraggio della Malattia Celiaca: Centro Trasfusionale – Laboratorio di Biologia Molecolare; [6]ASL Avezzano-Sulmona, Ospedale Civile di Sulmona- Laboratorio di Anatomia Patologica; [7]Divisione di Gastroenterologia Pediatrica, Policlinico Umberto I, Roma; [8]Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il morbo celiaco (MC) è una patologia autoimmune multi sistemica a predisposizione genetica ed è caratterizzata da una intolleranza permanente al glutine, una proteina che si trova nel frumento e cereali affini quali orzo e segale. L'ingestione di glutine, in soggetti geneticamente predisposti, provoca una reazione immunologica contro la mucosa duodenale con conseguente atrofia dei villi ed iperplasia delle cripte. I danni a carico della mucosa sono causa di malassorbimento intestinale e responsabili di gran parte dei sintomi di celiachia (diarrea, ritardo della crescita, anemia, osteoporosi ecc.). Nonostante in passato si è creduto che il MC fosse una malattia esclusivamente dei Paesi Occidentali, oggi è noto che ha una elevata frequenza anche nei Paesi in via di sviluppo, dove la presentazione spesso è drammatica. La malattia celiaca ha una prevalenza di 1:100 – 300 individui, sebbene al momento solo 1 persona su 8 risulta affetta con sintomi clinicamente non evidenti che possono essere moderati o del tutto non-specifici. Tale difficoltà diagnostica riguarda soprattutto la popolazione adulta. Poiché la percentuale di popolazione non diagnosticata è elevata, e diverse sono le patologie associate alla celiachia (diabete di tipo 1, tiroiditi ed epatiti autoimmuni, sindrome di Sjogren, disturbi neurologici – autismo, depressione, epilessia – cardiomiopatie, ostopenia, osteoporosi, infertilità, adenocarcinomi e linfomi Non-Hodgkin) è ipotizzabile una revisione dei criteri diagnostici che consenta diagnosi più precise e tempestive (Schuppan D., 2000, Shan L. et al., 2002, Sollid L.M., 2000).

La diagnosi di celiachia viene posta quando c'è la positività degli autoanticorpi anti Transglutaminasi (tTG-IgA o IgG in caso di deficit di IgA totali), o nei bambini con meno di due anni gli anticorpi anti gliadina IgA (AGA); l'esame istologico su biopsia duodenale rappresenta il "gold standard" diagnostico per la malattia celiaca, mettendo in rilievo la presenza di linfociti intraepiteliali, l'atrofia dei villi e l'iperplasia delle cripte (figura 1).

Uno dei punti fondamentali nella diagnosi della celiachia risulta essere la conta dei linfociti intraepiteliali (linfociti T) che deve essere in condizioni patologiche superiore a 25 linfociti per 100 cellule epiteliali. Questo dato è particolarmente importante soprattutto oggi in cui si assiste ad un continuo aumento diagnostico delle forme iniziali, lesioni di tipo 1 e 2 secondo Marsh o grado A secondo la classificazione Corazza-Villanacci (figura 2).

Vi sono alcuni casi di dubbia interpretazione per sierologia e/o istologia dubbia o assente; in tal caso può essere utile, soprattutto per escludere la diagnosi, la determinazione degli eterodimeri HLA DQ2 e DQ8, infatti in

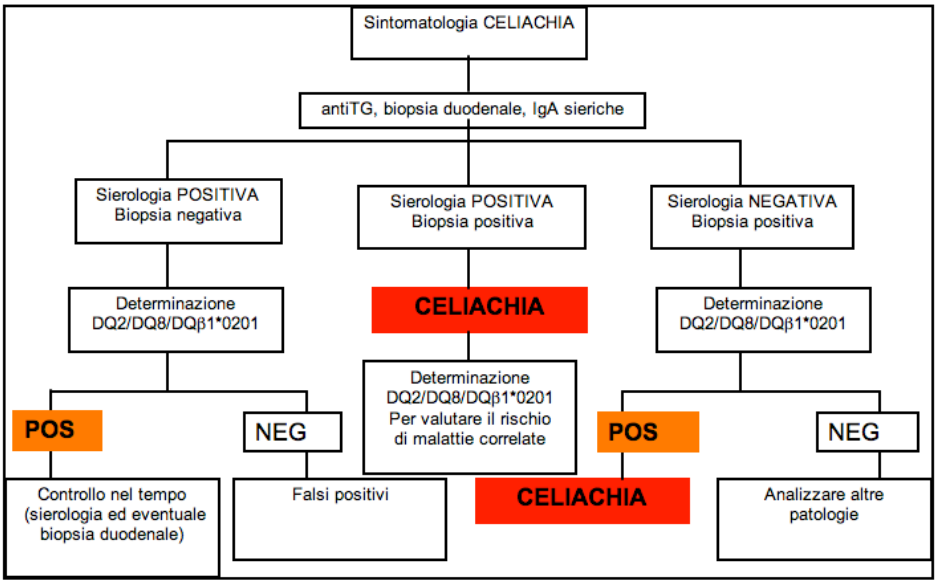

Figura 1. Algoritmo diagnostico per diagnosi di morbo celiaco. Chiaramente nei casi paucisintomatici si effettua prima la sierologia e solo in caso di positività la biopsia duodenale. Nello screening dei familiari di primo grado si determina l'HLA DQ e, solo in caso di positività, verranno controllati periodicamente per la sierologia

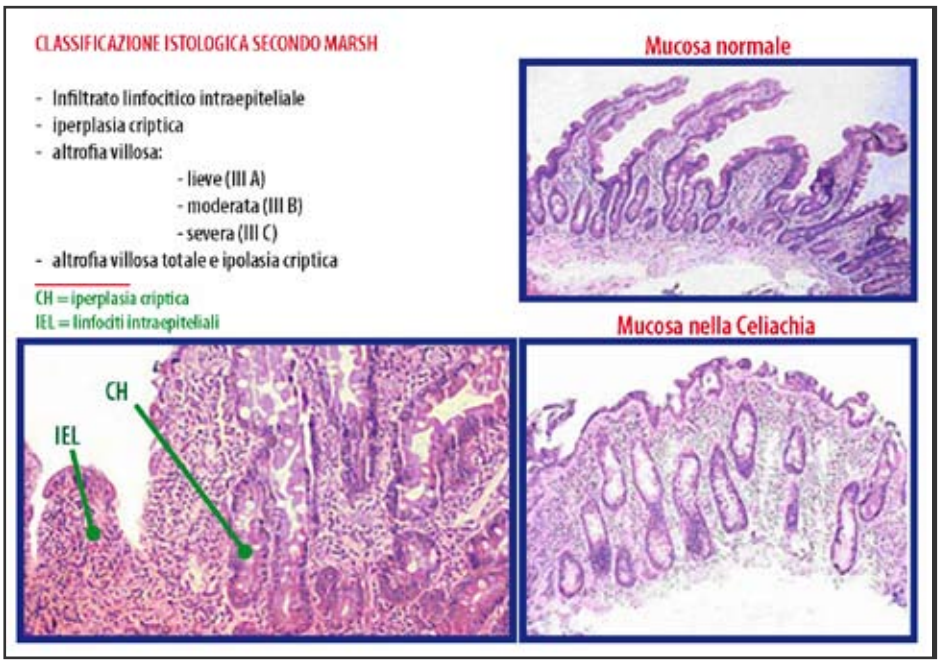

Figura 2. Mucosa intestinale normale e in pazienti affetti da celiachia. E' al momento un accertamento indispensabile per la diagnosi di celiachia, poiché i test anticorpali in mercato non raggiungono il 100% di specificità

caso di loro assenza la diagnosi viene esclusa. La ricerca delle molecole DQ2 e DQ8 andrebbe eseguita anche sui familiari del paziente celiaco, allo scopo di identificare casi di celiachia anomali o silenti.

La dieta senza glutine, al momento unica terapia efficace, provoca una progressiva riduzione della lesione fino alla rinormalizzazione della mucosa duodenale, e una graduale negativizzazione degli autoanticorpi (TGA, EMA). Sono in corso di valutazione e sperimentazione (alcune anche sull'uomo) terapie alternative alla dieta priva di glutine, grazie ad una migliore conoscenza dei meccanismi che sono alla base del MC (riduzione o degradazione dei peptidi tossici sulla materia prima o per via orale, inibitori della transglutaminasi di tipo2 e della risposta di tipo T, antagonisti del recettore della zonulina,..) (figura 3).

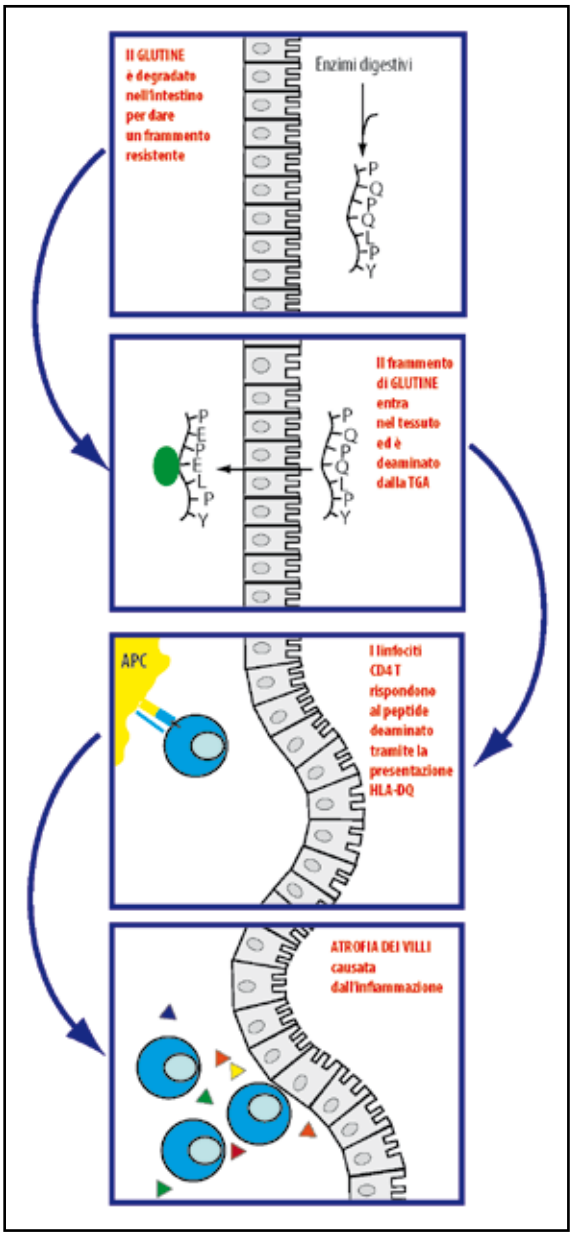

Figura 3. Schema del passaggio dei peptidi del glutine attraverso le "giunzioni strette" (tight junctions) delle cellule epiteliali intestinali con conseguente instaurazione della risposta infiammatoria locale.

Genetica e celiachia

La malattia celiaca è determinata geneticamente: nonostante esiste una evidente predisposizione familiare (circa il 15% dei parenti di primo grado di pazienti celiaci sviluppa a sua volta la patologia), la trasmissione non è di tipo mendeliano, ma poligenica multifattoriale: diversi geni devono interagire con fattori ambientali (dieta e probabili infezioni virali) per l'instaurarsi della malattia. E' ormai accertato che il MC ha una forte associazione con il sistema HLA (Sistema Maggiore di Istocompatibilà) di classe II, in particolare con le molecole HLA DQ2 ed HLA DQ8, ma tale fattore di rischio, legato al locus HLA-DQ non spiega interamente la suscettibilità genetica a sviluppare la patologia. La maggior parte dei pazienti celiaci (90%) possiede la molecola DQ2 (DQa1*05/DQb1*02), una minoranza (5%-10%) quella DQ8 (DQa1*0301/DQb1*0302) o l'allele DQb1*0201 in omozigosi, che conferiscono fino al 40% di rischio genetico di sviluppare la patologia. Questi geni però sono presenti anche nel 30% della popolazione generale, confermando quindi la componente multigenica del MC. Le molecole HLA hanno un ruolo importantissimo nella sorveglianza e protezione da agenti esterni e/o pericolosi per l'organismo. In particolare le molecole HLA di classe II hanno l'importante compito di presentare gli antigeni estranei ai linfociti T CD4+, attivandoli: in seguito a tale passaggio si instaura una reazione infiammatoria ed immunitaria per distruggere l'antigene presentato. I peptidi di glutine non sono completamente digeriti dagli enzimi gastrici, intestinali e pancreatici; è stato isolato un peptide composto da 33 aminoacidi in grado di reagire con la transglutaminasi tissutale (tTG), l'autoantigene della celiachia. La TG è un enzima in grado di riparare le lesioni della mucosa intestinale mediante reazioni di transamidazione; in particolari condizioni microambientali, la TG è in grado di svolgere reazioni di deaminazione: la deaminazione delle glutammine porta alla formazione di acido glutammico. Quando la deaminazione avviene a carico della gliadina, si producono cariche negative che favoriscono il legame del peptide alle molecole DQ2 e DQ8 responsabili dell'attivazione dei linfociti T presenti nell'intestino con successiva produzione di citochine e danno tissutale: le lesioni della mucosa intestinale probabilmente sono dovute alla produzione di INFγ da parte delle cellule T specifiche per il glutine e da una continua risposta infiammatoria organo specifica. Dunque uno dei principali fattori coinvolti nella patogenesi della celiachia è un difetto nella presentazione dell'antigene da parte delle cellule epiteliali insieme alle proprietà intrinseche della gliadina ed al particolare aplotipo HLA-DQ. Nonostante il meccanismo di danno tissutale sembra essere individuato in una risposta anormale del sistema immunitario in sede intestinale, la perdita della tolleranza al glutine probabilmente è legata a cambiamenti della permeabilità intestinale secondari ad un'alterazione delle "tight junctions", che lascerebbero penetrare i peptici "tossici" (Nilsen E.M. et al., 1998) (figura 4) (figura 5).

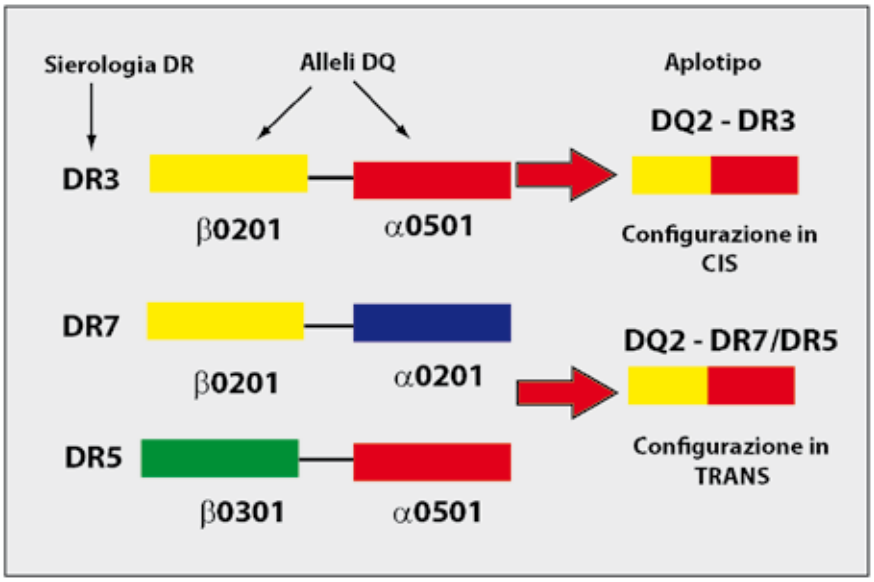

Figura 4. L'HLA nella celiachia.Geni HLA di classe II che codificano per l'eterodimero DQ2: è importante notare come i due alleli che permettono la formazione dell'eterodimero possono essere ereditati da un unico genitore (CIS) o un allele da un genitore ed un allele dall'altro (TRANS); nel caso aplotipo DQ2 ereditato in trans, potrebbero non esserci altri familiari di primo grado predisposti al MC.

Poichè la concordanza del MC in gemelli monozigotici è circa dell'80% mentre in gemelli dizigotici con aplotipo HLA identico è del 30%, è chiaro che altri geni sono coinvolti nell'instaurarsi della malattia stessa.

Al momento diversi studi sono stati condotti allo scopo di evidenziare altri loci genici coinvolti nella malattia, ma spesso sono discordanti tra di loro o non vengono confermati in studi condotti su popolazioni diverse.

Sommariamente, esistono particolari regioni genomiche probabilmente coinvolte nella predisposizione alla celiachia:

- una regione sul braccio lungo del cromosoma 5 (5q31-33) (CELIAC 2) contenente geni codificanti citochine e molecole proinfiammatorie;
- una sul braccio lungo del cromosoma 2 (2q31-33) (chiamata CELIAC 3) contenente i geni CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4), CD28 e ICOS (Inducible CO-stimulator genes), geni con funzione regolatoria sui linfociti T. Per quanto riguarda il gene CTLA-4 si è visto che un aplotipo (polimorfismi in successione sul gene) piuttosto comune sembra essere associato alla celiachia;

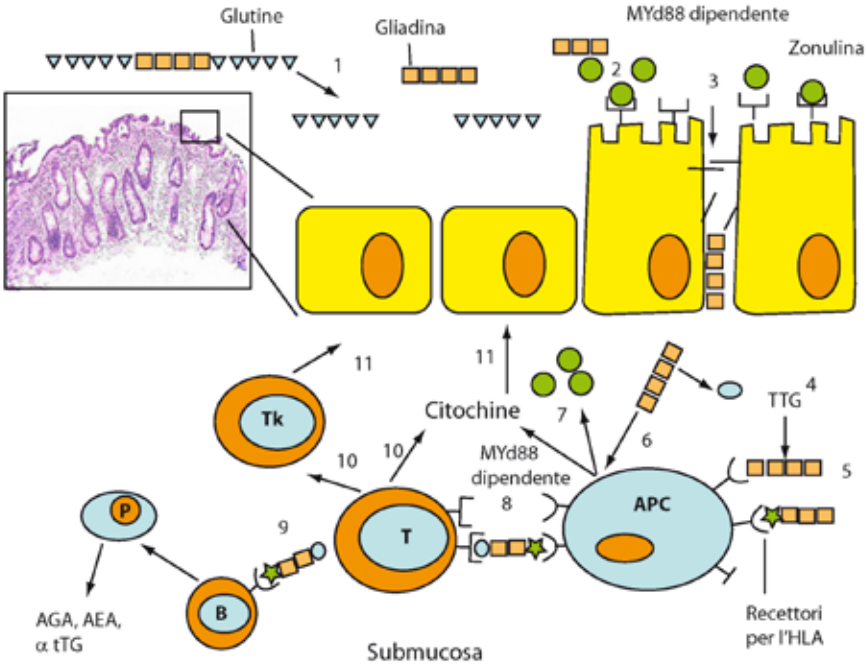

Figura 5. I frammenti di gliadina permettono una risposta autoimmunitaria, mediante produzione di anticorpi anti tTG.

- una sul cromosoma 19 (19p13) contenente il gene della miosina 9B (MYO9B), che potrebbe avere un ruolo nel rimodellamento degli enterociti, anche se i dati finora raccolti sono contrastanti. La miosina 9B è una proteina presente nel citoscheletro delle cellule, in grado di regolare la permeabilità intestinale, agendo sulle giunzioni intercellulari delle cellule epiteliali. Tale gene, o meglio un polimorfismo di tale gene è stato recentemente associato al linfoma intestinale a cellule T.
- Vi sono allo studio anche altre regioni di cui non si hanno dati significativi di associazione, sui cromosomi 4, 10, 11, 15 e 22.

Per concludere, le molecole HLA-DQ2 e DQ8 hanno un ruolo cruciale ma non sufficiente nell'insorgenza del MC (Wapenaar M.C. e Wijmenga C.,2005, Wolters V.M., Wijmenga C., 2008).

L'importanza dell'analisi di espressione genica mediante microarrays

Sebbene diversi aspetti della patogenesi di questa malattia sono stati svelati, esistono tuttora numerosi lati oscuri, sia sulla genetica di predisposizione sia su alcuni processi molecolari poco chiari dell'instaurazione della reazione immune e del rimodellamento della mucosa duodenale.

L'applicazione della tecnologia dei *microarrays* per lo studio dei fattori genetici coinvolti nel MC è stata spinta, dunque, dalla crescente necessità di analizzare in un singolo esperimento l'intero patrimonio genetico (genoma) dal punto di vista funzionale, ovvero attraverso l'analisi dei suoi prodotti di trascrizione (trascrittoma). Le complesse reti di modulazione dell'espressione genica differenziata, che consentono la traduzione di un genoma comune ai diversi tipi cellulari in uno stesso individuo, nelle caratteristiche morfologiche e funzionali specifiche di ogni cellula, sono difficili da decifrare con le metodiche tradizionali della biologia molecolare. Queste sono in grado di analizzare un gene o un prodotto genico alla volta, un limite insormontabile se si vuole capire il normale e coordinato funzionamento di decine di geni reclutati dalla cellula durante le risposte fisiologiche e le situazioni patologiche. Gli esperimenti che esaminano tutti i geni di un genoma su un singolo substrato procurano una visione globale del fenomeno biologico, impossibile da ottenere con tecnologie limitate a sottoinsiemi di geni.

Nel MC gli *arrays* di espressione genica possono essere utilizzati per:

- identificare le basi molecolari della malattia: il confronto dei profili di espressione tra cellule duodenali di pazienti affetti e non può essere un valido strumento per l'identificazione dei geni coinvolti nella patogenesi, come
  - fattori causali,
  - fattori di rischio predisponenti,
  - markers della progressione/ripresa di malattia (Sprue refrattaria).
- analizzare il meccanismo di azione del glutine, mettendo a confronto biopsie da pazienti celiaci a dieta con glutine (alla diagnosi) e dieta priva di glutine (in terapia). Il risultato dell'interazione del glutine con le molecole bersaglio può essere l'alterazione dell'espressione di geni. I *microarrays* possono essere utilizzati per identificare queste alterazioni, sia in studi *in vitro* mediante il confronto tra linee cellulari trattate e di controllo, sia in *trial* clinici mediante la caratterizzazione dei profili di espressione in pazienti sottoposti a trattamento. I profili di espressione associati al trattamento medico (dieta priva di glutine) possono essere utili anche per identificare l'alterazione dell'espressione di geni che provocano effetti

collaterali. Infine i profili di espressione associati a patologie correlate con il MC (stratificando i pazienti per presenza o meno delle diverse patologie) possono essere utili per identificare l'eventuale anomala espressione di geni responsabili delle altre condizioni autoimmuni associate alla celiachia.

Attualmente non sono molti gli studi di espressione genica del MC, sia *in vivo* che *in vitro*, mediante tecnologia *arrays*.

In un primo studio (Juuti-Uusitalo K. et al., 2004 e 2007) sono state analizzate, con la tecnologia cDNA *microarray* contenenti 5184 geni, biopsie duodenali da pazienti celiaci non trattati, da pazienti celiaci a dieta senza glutine, e da controlli sani. Sono stati evidenziati un numero di geni differenzialmente espressi nei pazienti celiaci non trattati rispetto ai trattati (n. 98) e ai controlli sani (n. 156), geni correlati all'attivazione di linfociti T e B, e geni coinvolti nel differenziamento delle cellule epiteliali. Inoltre nei soggetti posti a dieta senza glutine si è notata l'aumentata espressione del gene PP2A, che ha un ruolo nell'inibire l'attivazione di CTLA-4. CTLA-4 svolge un ruolo cruciale nel blocco dell'attivazione dei linfociti T e di conseguenza nell'inibizione della risposta immune, per cui la disregolazione di PP2A osservata nei celiaci non trattati potrebbe inibire CTLA4 e di conseguenza aumentare l'attivazione dei linfociti T. Il tentativo di identificare alterazione dell'espressione di geni compresi nelle regioni sospette di predisposizione (5q30-33 e 2q31-33) è fallito a causa del basso numero di geni appartenenti a queste regioni presente negli *array* utilizzati nel lavoro citato.

In uno studio successivo (Diosdado B. et al., 2004) sono stati utilizzati *microarray* contenenti 19200 geni (quasi 4 volte superiori dello studio precedente) e sono state esaminate biopsie di 15 pazienti celiaci con atrofia dei villi (stadio Marsh 3) comparate con 7 controlli, biopsie duodenali normali (Marsh 0); inoltre sono state comparate 7 biopsie da celiaci non trattati (M 3) con 4 biopsie da pazienti trattati con dieta senza glutine. Nello studio comparato Marsh 3 vs Marsh 0 sono stati individuati 109 geni differenzialmente espressi ($p<0.001$), di cui 76 con aumentata espressione e 33 con ridotta espressione. Questo studio conferma che la celiachia è una patologia mediata dai linfociti Th1 (*up*-regolazione del *pathway* dell'IL-2). Inoltre un buon numero dei geni evidenziati hanno funzioni in vie di proliferazione e differenziamento delle cellule epiteliali e possono avere un ruolo cruciale nella corretta formazione di villi e cripte. Ciò potrebbe suggerire che nell'instaurarsi della lesione celiaca possa essere rilevante un fallimento nel differenziamento cellulare. Inoltre nella comparazione di biopsie di pazienti celiaci non trattati con pazienti a dieta senza glutine sono stati evidenziati 120 geni con alterata espressione ($p<0.005$), con 75 iperespressi. Questo ha permesso di evidenziare, tra gli altri geni, la significativa iperespressione del gene PREP codificante per l'enzima prolil endopeptidasi nei celiaci a dieta con glutine rispetto ai trattati. La prolil endopeptidasi è un enzima che idrolizza regioni proteiche ricche di prolina

come la gliadina. Si è visto inoltre che anche nei controlli normali, con presenza di glutine nella dieta, si è evidenziata una iperespressione di PREP, per cui si è ipotizzato che il glutine induca l'espressione di questo gene, e inoltre che nei pazienti celiaci l'attività di questo enzima sia ridotta per cui la gliadina non verrebbe tagliata in frammenti più piccoli e di conseguenza privi di attività immunogena. Si è quindi ipotizzato che la prolil endopepidasi del batterio *Flavobacterium meningoseticum* possa in futuro essere utilizzata nel trattamento di pazienti celiaci (Troncone R. et al., 2008, Clemente M.G. et al., 2003, Fasano A. et al., 2000).

Sebbene i risultati di questi studi siano incoraggianti, al momento non sono stati ancora pubblicati altri studi che possano, sia confermare i risultati ottenuti, sia mettere in luce nuovi meccanismi molecolari patogenetici.

Il gruppo di ricerca del *Centro di Riferimento Regionale per la diagnosi ed il monitoraggio della Malattia Celiaca di Sulmona*, ha iniziato un studio condotto su biopsie di pazienti celiaci analizzandone l'espressione genica con *microarray* che permettono l'analisi contemporanea dell'espressione di 27.868 geni (notevolmente maggiore rispetto agli studi precedenti). Nello studio sono state inserite biopsie di pazienti ad uno stadio iniziale della patologia (Marsh 1) al fine di poter identificare marcatori precoci della lesione celiaca che possano spiegare l'instaurarsi della patologia, fornendo, forse, risposte su quali siano i primi fondamentali eventi che si verificano nella risposta immune contro la mucosa duodenale.

Un' analisi iniziale secondo il metodo CA (Cluster Analysis) ha evidenziato 153 geni differenzialmente espressi (78 iper-espressi e 75 *down*-espressi) quando il confronto è stato fatto tra biopsie duodenali di pazienti allo stadio Marsh 3 e stadio Marsh 0, e 763 geni differenzialmente espressi (394 iper-espressi e 396 *down*-espressi) quando il confronto è stato fatto tra biopsie duodenali di pazienti allo stadio Marsh III e stadio Marsh 1. In entrambi i casi si è evidenziata una iperespressione dei geni coinvolti nei *pathways* immunologici, con particolare riferimento ai geni coinvolti nell'attivazione dei linfociti T e B: è importante segnalare l'ipoespressione del gene Foxp3, marcatore delle cellule Treg, in grado di regolare la differenziazione e la proliferazione dei linfociti Th1. Altre categorie di geni la cui espressione è risultata modificata sono Fattori di trascrizione, Ubiquitine, Metabolismo degli aminoacidi, *Pathway* dell'insulina, Regolazione della matrice cellulare e Legame al DNA (figura 6).

In attesa di confermare i risultati mediante Real-time PCR, allo scopo di capire quali gruppi di geni si muovono contemporaneamente e la loro significatività nel MC, i dati sono in corso di valutazione mediante la metodologia PCA (Principal Component Analysis).

Un'applicazione molto promettente della metodologia array, potrebbe essere lo studio del cambiamento dell'espressione genica in sistemi in vitro

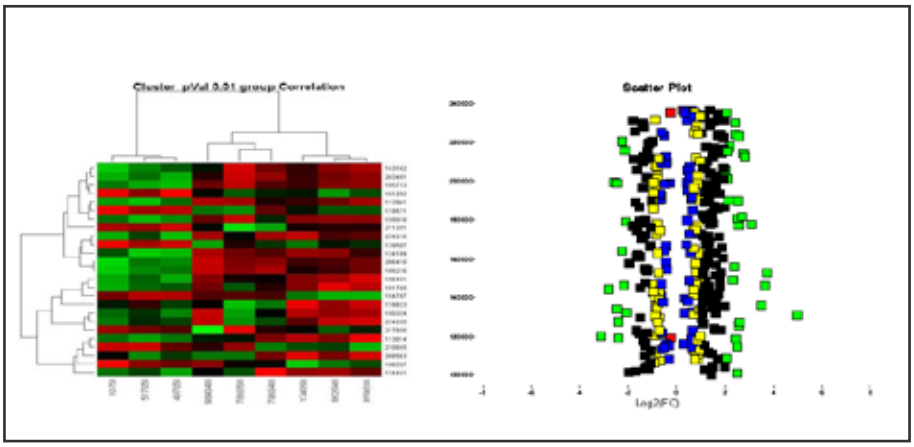

Figura 6. a) analisi arrays di biopsie duodenali di pz con Marsh 0 (colonne 1-3), pz con Mars 1 (lcolonne 4-6) e pz con Mars 3 (colonne 7-9); b) lo "scatter plot" permette una visualizzazione d'insieme dei geni differenzialmente espressi dopo applicazione dei calcoli statistici. I colori diversi dei puntini evidenziano il "fold change", cioè quante volte un gene è differenzialmente espresso nel tessuto in analisi rispetto al controllo.

di cellule epiteliali da pazienti celiaci, espanse in vitro e stimolate in presenza di diversi peptidi della gliadina.

Inoltre sarebbe opportuno completare l'analisi dell'espressione genica da cellule epiteliali di pazienti celiaci (in vivo ed in vitro) mediante l'analisi dei microRNA, regolatori negativi della trascrizione genica.

Prospettive future

In salute pubblica, lo scopo finale dell'unione della ricerca di base e di quella clinica dovrebbe essere migliorare la qualità della vita della popolazione, da una parte perfezionando strategie di prevenzione primaria e di diagnosi, e dall'altra migliorando i trattamenti per il Morbo Celiaco.

La prevenzione primaria richiederà l'unione di ricerche epidemiologiche, cliniche e di base. Questi studi dovranno tener conto anche dell'importanza della genetica delle cellule epiteliali nello sviluppo della celiachia. Dunque il criterio diagnostico potrebbe essere rivisto, portando certamente ad una migliore diagnosi e a programmi di prevenzione.

La conoscenza dell'eventuale disregolazione a livello intestinale nella patologia del Morbo Celiaco, associata ai dati già acquisiti (predisposizione HLA mediata), potrà permettere, chiaramente, lo sviluppo di farmaci in grado di migliorare la qualità di vita dei pazienti affetti da Celiachia.

In definitiva, lo studio della genetica di cellule epiteliali in vivo ed in vitro, in pazienti celiaci e controlli sani, potrebbe portare a definire con chiarezza i geni coinvolti nella malattia celiaca. Questo aprirebbe la strada a programmi di studio sull'interazione gene- ambiente, ma soprattutto a programmi di screening, evitando l'insorgenza di patologie correlate al Morbo Celiaco (Tiroiditi; Diabete di tipo 1; Linfoma).

Bibliografia

Clemente M.G., De Virgilis S., Kang J.S., Macatagney R., Musu M.P., Did Pierro M.R., Drago S., Congia M. Fasano A.: Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. Gut 2003 Feb, VOL:52(2), P:218.

Diosdado B., Wapenaar M.C., Franke L., Duran K.J., Goerres M.J., Hadithi M., Crusius J.B., Meijer J.W., Duggan D.J., Mulder C.J., Holstege F.C., Wijmenga C.: A microarray screen for novel candidate genes in celiac disease pathogenesis. Gut 2004 Jul, 53(7), P: 944.

Fasano A., Not T., Wang W., Uzzau S., Berti I., Tommasini A., Goldblum S.E.: Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. Lancet 2000 Apr, VOL:355(9214), P:1518.

Juuti-Uusitalo K., Mäki M., Kainulainen H., Isola J., Kaukinen K.: Gluten affects epithelial differentiation-associated genes in small intestinal mucosa of coeliac patients. Clin Exp Immunol 2007 Nov, VOL:150(2), P:294.

Juuti-Uusitalo K., Mäki M., Kaukinen K., Collin P., Visakorpi T., Vihinen M., Kainulainen H.: cDNA microarray analysis of gene expression in celiac disease jejunal biopsy samples. J Autoimm 2004 May, VOL:22(3), P:249.

Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid LM, Jahnsen J, Scott H, Brandtzaeg P.: Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. Gastroenterology 1998 Sep, VOL:115(3), P:551.

Schuppan D.: Current concepts of celiac disease pathogenesis. Gastroenterology 2000 Jul, VOL:119(1), P:234.

Shan L., Molberg Ø., Parrot I., Hausch F., Filiz F., Gray G.M., Sollid L.M., Khosla C.: Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. Science 2002 Sep, VOL:297(5590), P:2275.

Sollid LM.: Molecular basis of celiac disease. Annu Rev Immunol 2000, VOL:18, P:53.

Troncone R., Ivarsson A., Szajewska H., Mearin M.L., Members of European Multistakeholder Platform on CD (CDEUSSA).: Future research on coeliac disease - a position report from the European multistakeholder platform on coeliac disease (CDEUSSA). Aliment Pharmacol Ther 2008 Jun, VOL:27(11), P:1030.

Wapenaar M.C., Wijmenga C.: A combined genetics and genomics approach to unravelling molecular pathways in coeliac disease. Novartis Found Symp 2005, VOL:267, P:113.

Wolters V.M., Wijmenga C.: Genetic background of celiac disease and its clinical implications. Am J Gastroenterol 2008 Jan, VOL:103(1), P:190.

Si ringrazia il Signor Alessandro Spurio per il suo prezioso contributo nella realizzazione della parte grafica

Indice

Editoriale .....pag. 3

La Tecnologia dei Microarray nella Ricerca Oncologica
Biomedica e Clinica
Eleonora Aricò, Stefania Parlato, Luciano Castiello, Canini Irene,
Lucia Gabriele..... » 9

Studio di tumori pediatrici rari attraverso l'impiego di cDNA microarray
Marco Salvatore, Mara Viganotti, Stefano Lorenzetti ..... » 25

Microarray e celiachia
Camillo Di Tommaso, Mariano Magrì, Armando Capanna,
Panfilo Cantelmi, Paola Tataseo, Germano Gerosolimo,
Yvonne D'Alesio, Alessia Di Fonso, Flavio Rispoli, Cinzia Bascietto,
Cinzia Marcantonio, Leonardo Geraci e Francesco Bascietto ..... » 37

Indice..... » 51

Caleidoscopio
Italiano

...il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SpA

1. **Rassu S.:** ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. **Rassu S.:** ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. **Rassu S.:** ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.:** ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. **Rassu S.:** ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. **Rassu S.:** ***L'obesita'.*** **Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:*****Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (1).*** **Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaio'85.**
11. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. **Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.:** ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. **Facchinetti F. e Petraglia F.:** ***La β-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. **Nuti R.:** ***Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.*** **Febbraio '86**
18. **Cavallaro E.:** ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. **Fanetti G.:** ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. **Limone P.:** ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.:** ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.*** **Novembre '86.**
23. **Bolcato A.:** ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio enzimoimmunologico e fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**
25. **Carani C.:** ***Patologie sessuali endocrino-metaboliche.*** **Marzo '87.**
26. **Sanna M., Carcassi R., Rassu S.:** ***Le banche dati in medicina.*** **Maggio '87.**
27. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:** ***L'amenorrea.*** **Giugno '87.**
28. **Zilli A., Pagni E., Piazza M.:** ***Il paziente terminale.*** **Luglio '87.**
29. **Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.:** ***Patologie prostatiche.*** **Settembre '87.**
30. **Cingolani M.:** ***Manuale di ematologia e citologia ematologica.*** **Novembre '87.**

31. Kubasik N.P.: ***Ibridomi ed anticorpi monoclonali.*** **Gennaio '88.**
32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: ***Diagnostica del carcinoma mammario.*** **Febbraio '88.**
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: ***Neuroendocrinologia dello stress.*** **Marzo '88.**
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: ***La fecondazione*** **in vitro. Maggio '88.**
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: ***Il gozzo nodulare.*** **Giugno '88.**
36. Baccini C.: ***Le droghe d'abuso (2).*** **Luglio '88.**
37. Piantino P., Pecchio F.: ***Markers tumorali in gastroenterologia.*** **Novembre '88.**
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: ***Le leucemie acute infantili.*** **Gennaio '89.**
39. Sommariva D., Branchi A.: ***Le dislipidemie.*** **Febbraio '89.**
40. Butturini U., Butturini A.: ***Aspetti medici delle radiazioni.*** **Marzo '89.**
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: ***Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.*** **Aprile '89.**
42. Palleschi G.: ***Biosensori in Medicina.*** **Maggio '89.**
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: ***HTLV-I.*** **Giugno '89.**
44. Fanetti G.: ***Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.*** **Luglio '89.**
45. Contu L., Arras M.: ***Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.*** **Settembre '89.**
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: ***Immunologia dell'occhio.*** **Ottobre '89.**
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: ***Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.*** **Gennaio '90.**
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: ***La coriogonadotropina umana.*** **Febbraio '90.**
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: ***L'immunologia del diabete mellito.*** **Marzo '90.**
50. Cappi F.: ***La trasfusione di sangue: terapia a rischio.*** **Aprile '90.**
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: ***I micobatteri.*** **Maggio '90.**
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: ***Anticorpi antinucleo.*** **Giugno '90.**
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: ***Le macchine in terapia intensiva.*** **Luglio '90.**
54. Goracci E., Goracci G.: ***Gli allergo-acari.*** **Agosto '90.**
55. Rizzetto M.: ***L'epatite non A non B (tipo C).*** **Settembre '90.**
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: ***Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali.*** **Ottobre '90.**
57. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (I).*** **Gennaio '91.**
58. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (II).*** **Febbraio '91.**
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: ***Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti.*** **Marzo '91.**
60. Bedarida G., Lizioli A.: ***La neopterina nella pratica clinica.*** **Aprile '91.**
61. Romano L.: ***Valutazione dei kit immunochimici.*** **Maggio '91.**
62. Dondero F. e Lenzi A.: ***L'infertilità immunologica.*** **Giugno '91.**
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: ***Gli Oncogèni.*** **Luglio '91.**
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: ***Infezione-malattia da HIV in Africa.*** **Agosto '91.**
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: ***L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni.*** **Settembre '91.**
66. Gentilomi G.A.: ***Sonde genetiche in microbiologia.*** **Ottobre '91.**
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: ***Le sonde di DNA e la virulenza batterica.*** **Gennaio '92.**

68. Zilli A., Biondi T.: ***Il piede diabetico.*** **Febbraio '92.**
69. Rizzetto M.: ***L'epatite Delta.*** **Marzo '92.**
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: ***Gli screening neonatali.*** **Aprile '92.**
71. Tavani A., La Vecchia C.: ***Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari.*** **Luglio '92.**
72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: ***L'ormone della crescita.*** **Agosto '92.**
73. Contu L., Arras M.: ***Molecole di membrana e funzione immunologica (I).*** **Settembre '92.**
74. Ferrara S.:***Manuale di laboratorio I.*** **Ottobre '92.**
75. Gori S.: ***Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti.*** **Novembre '92.**
76. Ferrara S.: ***Manuale di laboratorio II.*** **Gennaio '93.**
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: ***Ipertensione Arteriosa.*** **Febbraio '93.**
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: ***I linfomi non Hodgkin.*** **Marzo '93.**
79. Arras M., Contu L.: ***Molecole di membrana e funzione immunologica (II).*** **Aprile '93.**
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: ***Terapia antiretrovirale.*** **Maggio '93.**
81. Rizzetto M.: ***L'epatite C.*** **Settembre '93.**
82. Andreoni S.: ***Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti.*** **Ottobre '93.**
83.Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: ***Diagnostica con radionuclidi del Morbo di Graves-Basedow.*** **Novembre '93.**
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: ***Chemiluminescenza.*** **Dicembre '93.**
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: ***Applicazioni degli esami immunologici.*** **Gennaio 94.**
86. Arras M., Contu L.: ***Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B.*** **Febbraio '94.**
87. Rossetti R.: ***Gli streptoccocchi beta emolitici di gruppo B (SGB).*** **Marzo '94.**
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: ***Marcatori biochimici del rimodellamento osseo.*** **Aprile '94.**
89. Fanetti G.: ***Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare.*** **Settembre '94.**
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: ***Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario.*** **Ottobre '94.**
91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: ***Helicobacter pylori.*** **Novembre '94.**
92. Parazzini F.: ***L'epidemiologia della patologia ostetrica.*** **Febbraio '95.**
93. Proietti A., Lanzafame P.: ***Il virus di Epstein-Barr.*** **Marzo '95.**
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P, Romano L.: ***Immunoflogosi nell'asma bronchiale.*** **Maggio '95.**
95. Manduchi I.: ***Steroidi.*** **Giugno '95.**
96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: ***Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale.*** **Luglio '95.**
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: ***Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani.*** **Ottobre '95.**
98.La Vecchia C., D'Avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: ***Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica.*** **Dicembre '95.**
99.Zilli A., Biondi T., Conte M.: ***Diabete mellito e disfunzioni conoscitive.*** **Gennaio '96.**
100.Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: ***Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma.*** **Marzo '96.**
101.Cogato I. Montanari E.: ***La Sclerosi Multipla.*** **Aprile '96.**

102.Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: *Malattie a trasmissione sessuale.* Maggio '96.
103.Fiori G. M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giugno '96.
104.Marcante R., Dalla Via L.: *Il virus respiratorio sinciziale*. Luglio '96.
105.Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: *Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tissutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative.* Ottobre '96.
106.Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: *Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale*. Novembre '96.
107.Morganti R.: *Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali*. Dicembre '96.
108.Andreoni S.: *Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti*. Gennaio '97.
109.Salemi A., Zoni R.: *Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi*. Febbraio '97.
110.Meisner M.: *Procalcitonina*. Marzo '97.
111.Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.: *Malattie a trasmissione sessuale (2)*. Aprile '97.
112.Palleschi G. Moscone D., Compagnone D.: *Biosensori elettrochimici in Biomedicina.* Maggio '97.
113.Valtriani C., Hurle C.: *Citofluorimetria a flusso*. Giugno '97.
114.Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barcucci P.: *Alcol e problemi correlati*. Settembre '97.
115.Piccinelli M.: *Depressione Maggiore Unipolare*. Ottobre '97.
116.Pepe M., Di Gregorio A.: *Le Tiroiditi*. Novembre '97.
117.Cairo G.: *La Ferritina*. Dicembre '97.
118.Bartoli E.: *Le glomerulonefriti acute*. Gennaio '98.
119.Bufi C., Tracanna M.: *Computerizzazione della gara di Laboratorio*. Febbraio '98.
120.National Academy of Clinical Biochemistry: *Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide.* Marzo '98.
121.Fava G., Rafanelli C., Savron G.: *L'ansia*. Aprile '98.
122.Cinco M.: *La Borreliosi di Lyme*. Maggio '98.
123.Giudice G.C.: *Agopuntura Cinese*. Giugno '98.
124.Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (1)*. Luglio '98.
125.Rossi R.E., Monasterolo G.: *Basofili*. Settembre '98.
126. Arcari R., Grosso N., Lezo A., Boscolo D., Cavallo Perin P.: *Eziopatogenesi del diabete mellito di tipo 1*. Novembre '98.
127.Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (1I)*. Dicembre '98.
128.Muzi P., Bologna M.: *Tecniche di immunoistochimica*. Gennaio '99.
129.Morganti R., Pistello M., Vatteroni M.L.: *Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivirali*. Febbraio '99.
130.Castello G., Silvestri I.:*Il linfocita quale dosimetro biologico*. Marzo '99.
131.AielloV., Caselli M., Chiamenti C.M.: *Tumorigenesi gastrica Helicobacter pylori - correlata.* Aprile '99.
132.Messina B., Tirri G., Fraioli A., Grassi M., De Bernardi Di Valserra M.: *Medicina Termale e Malattie Reumatiche.* Maggio '99.
133.Rossi R.E., Monasterolo G.: *Eosinofili.* Giugno '99.
134.Fusco A., Somma M.C.: *NSE (Enolasi Neurono-Specifica)*. Luglio '99.
135.Chieffi O., Bonfirraro G., Fimiani R.: *La menopausa*. Settembre '99.

136.Giglio G., Aprea E., Romano A.: ***Il Sistema Qualità nel Laboratorio di Analisi.*** **Ottobre '99.**
137.Crotti D., Luzzi I., Piersimoni C.: ***Infezioni intestinali da Campylobacter e microrganismi correlati.*** **Novembre '99.**
138.Giovanella L.: ***Tumori Neuroendocrini: Diagnosi e fisiopatologia clinica.*** **Dicembre '99.**
139.Paladino M., Cerizza Tosoni T.: ***Umanizzazione dei Servizi Sanitari: il Case Management.*** **Gennaio 2000.**
140.La Vecchia C.: ***Come evitare la malattia.*** **Febbraio 2000.**
141.Rossi R.E., Monasterolo G.: ***Cellule dendritiche.*** **Marzo 2000.**
142.Dammacco F.: ***Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (I).*** **Aprile 2000.**
143.Dammacco F.: ***Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (II).*** **Maggio 2000.**
144.Croce E., Olmi S.: ***Videolaparoscopia.*** **Giugno 2000.**
145.Martelli M., Ferraguti M.: ***AllergoGest.*** **Settembre 2000.**
146.Giannini G., De Luigi M.C., Bo A., Valbonesi M.: ***TTP e sindromi correlate: nuovi orizzonti diagnostici e terapeutici.*** **Gennaio 2001.**
147.Rassu S., Manca M.G., Pintus S., Cigni A.: ***L'umanizzazione dei servizi sanitari.*** **Febbraio 2001.**
148. Giovanella L.: ***I tumori della tiroide.*** **Marzo 2001.**
149.Dessì-Fulgheri P., Rappelli A.: ***L'ipertensione arteriosa.*** **Aprile 2001.**
150. The National Academy of Clinical Biochemistry: ***Linee guida di laboratorio per lo screening, la diagnosi e il monitoraggio del danno epatico.*** **Settembre 2001.**
151.Dominici R.: ***Riflessioni su Scienza ed Etica.*** **Ottobre 2001.**
152.Lenziardi M., Fiorini I.: ***Linee guida per le malattie della tiroide.*** **Novembre 2001.**
153.Fazii P.: ***Dermatofiti e dermatofitosi.*** **Gennaio 2002.**
154.Suriani R., Zanella D., Orso Giacone G., Ceretta M., Caruso M.: ***Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) Eziopatogenesi e Diagnostica Sierologica.*** **Febbraio 2002.**
155. Trombetta C.: ***Il Varicocele.*** **Marzo 2002.**
156.Bologna M., Colorizio V., Meccia A., Paponetti B.: ***Ambiente e polmone.*** **Aprile 2002.**
157. Correale M., Paradiso A., Quaranta M.: I ***Markers tumorali.*** **Maggio 2002.**
158. Loviselli A., Mariotti S.: ***La Sindrome da bassa T3.*** **Giugno 2002.**
159. Suriani R., Mazzucco D., Venturini I., Mazzarello G., Zanella D., Orso Giacone G.: ***Helicobacter Pylori: stato dell'arte.*** **Ottobre 2002.**
160. Canini S.: ***Gli screening prenatali: marcatori biochimici, screening nel 1° e 2° trimestre di gravidanza e test integrato.*** **Novembre 2002.**
161. Atzeni M.M., Masala A.: ***La β-talassemia omozigote.*** **Dicembre 2002.**
162. Di Serio F.: ***Sindromi coronariche acute.*** **Gennaio 2003.**
163. Muzi P., Bologna M.: ***Il rischio di contaminazione biologica nel laboratorio biosanitario.*** **Febbraio 2003.**
164. Magni P., Ruscica M., Verna R., Corsi M.M.: ***Obesità: fisiopatologia e nuove prospettive diagnostiche.*** **Marzo 2003.**
165. Magrì G.: ***Aspetti biochimici e legali nell'abuso alcolico.*** **Aprile 2003.**
166. Rapporto dello Hastings Center: ***Gli scopi della medicina: nuove priorità.*** **Maggio 2003.**
167. Beelke M., Canovaro P., Ferrillo F.: ***Il sonno e le sue alterazioni.*** **Giugno 2003.**

168. Macchia V., Mariano A.: ***Marcatori tumorali nel cancro della vescica*****. Luglio 2003.**
169. Miragliotta G., Barra Parisi G., De Sanctis A., Vinci E.: ***La Turbercolosi Polmonare: Diagnostica di Laboratorio*****. Agosto 2003.**
170. Aebischer T.: ***Il Comitato Internazionale della Croce Rossa ed il Diritto Internazionale Umanitario*****. Settembre 2003.**
171. Martino R., Frallicciardi A., Tortoriello R.: ***Il manuale della sicurezza*****. Ottobre 2003.**
172. Canigiani S. e Volpini M.: ***Infarto acuto del miocardio: biochimica del danno cellulare e marcatori di lesione.*** **Novembre 2003.**
173. La Brocca A. Orso Giacone G. Zanella D. Ceretta M.: ***Laboratorio e clinica delle principali affezioni tiroidee.*** **Dicembre 2003.**
174. Savron G.: ***Le Fobie*****. Gennaio 2004.**
175. Paganetto G.: ***Evoluzione storica del rischio di patologie umane per contaminazione chimica ambientale*****. Febbraio 2004.**
176. Giovanella L.: ***Iperparatiroidismo e tumori paratiroidei*****. Marzo 2004.**
177. Severino G., Del Zompo M.: ***Farmacogenomica: realtà e prospettive per una "Medicina Personalizzata".*** **Aprile 2004.**
178 Arigliano P.L.: ***Strategie di prevenzione dell'allergia al lattice nelle strutture sanitarie.*** **Maggio 2004.**
179. Bruni A.: ***Malattia di Alzheimer e Demenza Frototemporale.*** **Giugno 2004.**
180. Perdelli F., Mazzarello G., Bassi A.M., Perfumo M., Dallera M.: ***Eziopatogenesi e diagnostica allergologica.*** **Luglio 2004.**
181. Franzoni E., Gualandi P. Pellegrini G.: ***I disturbi del comportamento alimentare.*** **Agosto 2004.**
182. Grandi G., Peyron F.: ***La toxoplasmosi congenita*****. Settembre 2004.**
183. Rocca D.L., Repetto B., Marchese A., Debbia E.A: ***Patogeni emergenti e resistenze batteriche*****. Ottobre 2004.**
184. Tosello F., Marsano H.: ***Scientific English Handout*****. Novembre 2004.**
185. La Brocca A., Orso Giacone G., Zanella D.: ***Ipertensione arteriosa secondaria: clinica e laboratorio*****. Dicembre 2004.**
186. Paganetto G.: ***Malattie Neoplastiche: dalla Paleopatologia alle Fonti Storiche*****. Gennaio 2005.**
187. Savron G.: ***La sindrome dai mille tic: il disturbo di Gilles de la Tourette*****. Febbraio 2005.**
188. Magrì G., Baghino E., Floridia M., Ghiara F.: ***Leishmania.*** **Marzo 2005.**
189. Lucca U., Forloni G., Tiraboschi P., Quadri P., Tettamanti M., PasinaL.: ***Invecchiamento, deterioramento cognitivo e malattia di Alzheimer*****. Aprile 2005.**
190. Volpe G., Delibato E., Orefice L., Palleschi G.: ***Tossinfezioni alimentari e metodiche recenti ed innovative per la ricerca dei batteri patogeni responsabili*****. Maggio 2005.**
191. Mazzarello M.G., Albalustri G., Audisio M., Perfumo M., L. Cremonte G.: ***Aerobiologia ed allergopatie*****. Giugno 2005.**
192. Scalabrino G., Veber D., Mutti E.:***Nuovi orizzonti biologici per la vitamina B12*****. Luglio 2005.**
193. Zepponi E.: ***Guida pratica per gli utenti del laboratorio analisi*****. Settembre 2005.**
194. Faricelli R., Esposito S., Martinotti S.: ***La sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi.*** **Ottobre 2005.**
195. Baccini C., Bezzi F., Conti M., Tazzari V.: ***Doping e antidoping nello sport*****. Novembre 2005.**

196. Lozzi M.: ***La Mediazione pacifica dei conflitti. Una risorsa socio-relazionale in ambito medico-sanitario*****. Dicembre 2005.**
197. Bracco G.: ***Progettare un Laboratorio di Analisi*****. Gennaio 2006.**
198. Angelucci A.: ***Apoptosi e sistema immunitario: regolazione e patologie associate*****. Febbraio 2006.**
199. Commissione Tecnica sul Rischio Clinico: ***Risk management in Sanità. Il problema degli errori*****. Marzo 2006**
200. Casati G., Marchese E., Roberti V., Vichi M.C.: ***La gestione dei processi clinico assistenziali per il miglioramento delle prassi*****. Aprile 2006.**
201. Zanella D., Ceretta M., Orso Giacone G.: ***Peptidi natriuretici: nuove frontiere in cardiologia?*** **Maggio 2006.**
202. Cicala M., Dal Lago U., Vinci P., Maggiorotti M.: ***L'accusa di malpractice in ambito medico*****. Giugno 2006.**
203. Martino R.: ***Manuale Qualità UNI EN ISO 9001*****. Luglio 2006.**
204. Mazzarello M.G., Arata M., Perfumo M., Marchese A., Debbia E.A.: ***Tubercolosi e micobatteri*****. Settembre 2006.**
205. Matrullo R.: ***Anoressia: la negazione della sessualità come difesa narcisistica*****. Ottobre 2006.**
206. Crotti D.: ***Le parassitosi intestinali ed uro-genitali*****. Novembre 2006.**
207. Orso Giacone G., Zanella D., Ceretta M.: ***Il referto interpretativo in infettivologia*****. Dicembre 2006.**
208. Baghino E., Magrì G., Nicoletti L., Novaro G., Vignale C., Mazzei C.: ***Stato dell'arte delle aneuploidie fetali, dall'indagine clinica prenatale alla diagnosi anatomo-patologica*****. Gennaio 2007.**
209. Mazzarello M.G., Brunetti R., Perfumo M., Torriglia A.M., Montresor G.: ***Principali Tecniche Analitiche in uso nei Laboratori di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche*****. Febbraio 2007.**
210. Orso Giacone G., Zanella D., Ceretta M.: ***Celiachia dalla A alla Z*****. Marzo 2007.**
211. Cingolani M., Sparviero E.: ***Decidere ora per allora: il testamento biologico (dichiarazioni anticipate di trattamento). Aprile 2007.***
212. Barletta G., Pastacaldi V., Peracino A.P.: ***La misura dei processi nella medicina di laboratorio*****. Maggio 2007.**
213. Rassu S., Masia L., Delussu P., Chessa P., Demartis M.G., Moroso G.: ***Manuale per il supporto vitale di base e la defibrillazione precoce (BLS-D)*****. Giugno 2007.**
214. Anchisi R., M. Gambotto Dessy: ***Il Burnout del personale sanitario*****. Marzo 2008.**
215. Gulletta E., Orrico F., Foti D.P.: ***Clinical Governance nel Laboratorio Biomedico*****. Aprile 2008.**
216. Rochira V., Scaltriti S., Zirilli L., Carani C.: ***Il ruolo degli estrogeni nel maschio*****. Maggio 2008.**
217. Gulletta E., Foti D.P., Corsi M.M., Galliera E.: ***Citochine e Chemochine*****. Giugno 2008.**
218. Zambotto F.M.: ***La biotecnologia transgenica utilizzata nella produzione degli alimenti di origine vegetale*****. Settembre 2008**
219. Cavallini M.: ***Tecniche di Ringiovanimento del viso*****. Ottobre 2008**

220. Morra A., Odetto L., Bozza C., Bozzetto P., Agostinis S., Bariona M.: *Compendio di Medicina delle Grandi Emergenze*. Novembre 2008.
221. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: *I Microarray*. **Dicembre 2008.**
222. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: *Applicazioni dei microarray (1)*. **Marzo 2009**

I volumi disponibili su Internet nel sito www.medicalsystems.it sono riportati in nero mentre in grigio quelli non ancora disponibili su Internet.

Inoltre sono disponibili un limitato numero di copie di alcuni numeri del Caleidoscopio che ormai sono "storiche". Qualora mancassero per completare la collana potete farne richiesta al collaboratore Medical Systems della Vostra zona. I numeri sono: Caleidoscopio 14, 18, 33, 40, 48, 49, 50, 54, 65, 68, 84, 100, 106, 118, 121, 126, 129, 130, 131, 132, 133, 134. I volumi verranno distribuiti sino ad esaurimento e non verranno ristampati se non in nuove edizioni.

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 26, numero 222

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Tel. mobile 338 2202502
E-mail: sergiorassu@yahoo.it

Responsabile Ufficio Acquisti
Giusi Cunietti

Servizio Abbonamenti
Maria Grazia Papalia
Laura Cecchi

Progettazione e Realizzazione

Restless Architect of Human Possibilities s.a.s.
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel. 079 5907759
http://rahp80.googlepages.com/

Consulenti di Redazione
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione
Maria Speranza Giola

EDITORE

...il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS Sp

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. 010 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);
Telefax 010/8340310- 809070.
Internet URL: http://www.medicalsystems.it
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio Illustrato, Caleidoscopio Letterario, Guida Pratica Immulite®, Guida Pratica Città, Journal of Clinical Ligand Assay, Pandora, Tribuna Biologica e Medica.

Stampa
Tipolitografia Nuova ATA
Via Gelasio Adamoli, 281 - Genova
Tel. 010 513120 - Fax 010 503320 - info@nuovaata.com - www.nuovaata.com

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989
Iscrizione al Registro degli Operatori di Comunicazione (ROC) n° 1188

Finito di stampare: Marzo 2009
Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano