www.medicalsystems.it

ISSN 0394 3291

Caleidoscopio Italiano

Mario Correale **Angelo Paradiso**
Michele Quaranta

I Markers tumorali

Storia, applicazioni e prospettive

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

157

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

Spedizione A.P. 45% - art.2 comma 20/b legge 662/96 - n° 157 - Maggio 2002 - Direttore responsabile: Sergio Rassu - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: La Stampa SpA - Genova

Caleidoscopio
Italiano

Mario Correale[1] **Angelo Paradiso**[2]
Michele Quaranta[3]

[1]Laboratorio di Patologia Clinica IRCCS De Bellis Castellana Grotte (Bari); [2]Laboratorio di Oncologia Sperimentale Clinica IRCCS Oncologico Bari; [3]Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche, Microbiologia, Radioimmunologia, Immunoematologia IRCCS Oncologico Bari

I Markers tumorali

Storia, applicazioni e prospettive

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

157

... 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. Si prega di 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. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

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 le fotografie in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spedite 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 Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Editoriale

Il ricco curriculum degli Autori di questa monografia ci induce a passare direttamente, per motivi di spazio, alla loro presentazione.

Il dottor Mario Correale ha conseguito la Laurea in Medicina e Chirurgia e le Specializzazioni in Patologia Generale ed Oncologia presso l'Università di Bari. Iscritto all'albo dell'*European Communities Confederation of Clinical Chemistry* (EC4), dopo un'intensa attività scientifica e clinica presso l'IRCCS Oncologico di Bari, è stato primario nei Laboratori del P.O. di Lucera (FG) e dell'A.O. San Carlo di Potenza. Attualmente è Direttore dell'U.O.C. Laboratorio di Patologia Clinica dell'IRCCS De Bellis di Castellana Grotte (BA). Componente del Comitato Nazionale Marcatori Tumorali della SIPDTT e del Gruppo di Studio SIBioC sui Markers Tumorali, fa parte del Board delle riviste *The International Journal of Biological Markers* e *Journal of Clinical Ligand Assay* (ed. italiana). Tra i numerosi incarichi, ricordiamo che è delegato Regionale per la Puglia della Società Italiana Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC); è Socio Fondatore e Probiviro dell'APULA; è componente del CTS per la Valutazione della Qualità in Medicina di Laboratorio presso l'Assessorato alla Sanità della Regione Puglia. Già Coordinatore dell'Ufficio Attività Didattiche dell'IRCCS Oncologico di Bari, ha curato la segreteria scientifica e/o organizzativa ed è stato docente in numerosissimi Convegni e Corsi a carattere nazionale ed internazionale. Autore di oltre 120 pubblicazioni e 300 fra abstract e comunicazioni a Congressi, è ricercatore responsabile e associato in numerosi Progetti di Ricerca del Ministero della Salute e dell'AIRC.

Il dottor Angelo Virgilio Paradiso ha conseguito la laurea in Medicina e Chirurgia, il Diploma di Specializzazione in Oncologia e il Diploma Specializzazione in Farmacologia Applicata presso l'Università di Bari. Vincitore di diverse Borse di Studio, è stato Assistente Medico, quindi Aiuto Corresponsabile presso la Divisione di Oncologia Medica, Laboratorio Oncologia Sperimentale e attualmente è Direttore del Laboratorio di Oncologia Sperimentale Clinica e Vice Direttore Scientifico dell'Istituto Oncologico di Bari (IOB).

Tra i tanti incarichi ufficiali ricordiamo che è Membro del Comitato Scientifico della Società Italiana di Cinetica Cellulare di Base e Applicata (SIC-

CAB), è Vicepresidente Nazionale del Comitato Italiano Controllo Qualità Laboratorio Oncologico; è Presidente del Gruppo di Studio della Biologia del Carcinoma Mammario (G.S.Bio.Ca.M.), è Membro del *Working Group on Living with Breast Cancer*, è Direttore del programma nazionale del Ministero della Sanità per la validazione di nuovi biomarcatori; è Responsabile di Progetti Finalizzati CNR, Ministero Sanità ed AIRC, è Responsabile dei rapporti del programma *Early Detection Research Network* dell'NIH-NCI con l'EORTC, è Membro del *Receptor Biomarker Study Group* dell'EORTC. Per questa intensa attività ha ricevuto numerosi riconoscimenti: il Premio Nazionale "G. Marinaccio", il Premio Internazionale Città di Fiuggi della Università dell'Alabama-USA, il Premio Nazionale "Giorgio Prodi", il Premio Nazionale della Accademia Nazionale Medicina FORUM. Autore di circa 190 pubblicazioni per esteso edite a stampa, collabora all'Editorial Board di alcune riviste nazionali ed internazionali.

Il dottor Michele Quaranta ha conseguito la Laurea in Medicina e Chirurgia e la Specializzazione in Igiene e Medicina Preventiva, in Oncologia con successivo corso di perfezionamento presso l'Università degli Studi di Bari. Dopo aver ricoperto il ruolo di assistente presso l'Istituto di Igiene dell'Università degli Studi di Bari è passato all'U.O. del Laboratorio di Analisi dell'Ospedale Oncologico - IRCCS di Bari, diventando presto Aiuto e quindi Primario. E' stato inoltre delegato al coordinamento dei Laboratori della Direzione Scientifica, al controllo dei progetti di ricerca e alla gestione del personale addetto alla ricerca biomedica. Ha partecipato come relatore a numerosi congressi e corsi di aggiornamento regionali, nazionali ed internazionali. E' autore di oltre cento pubblicazioni su riviste nazionali ed internazionali e 195 tra abstracts e comunicazioni a Congressi. Ha ricoperto e ricopre numerosi incarichi ufficiali: ha fatto parte del Consiglio Direttivo della Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori, Sezione Provinciale di Bari di cui è attualmente Presidente, ricoprendo anche l'incarico di rappresentante presso l'*European Cancer Leagues*. E' stato presidente del Comitato Regionale per la Lotta al Fumo, e di altri Gruppo di Lavoro Nazionali sullo stesso tema; è Responsabile, infine di diversi Progetti di Ricerca Finalizzati del Ministero della Sanità.

Il lavoro di questi tre autori è stato validamente supportato dai rispettivi collaboratori che vanno giustamente ricordati: Mario Correale con la collaborazione di Antonio Iacobacci, Palma Aurelia Iacovazzi e Domenico Barletta hanno curato i capitoli: L'evoluzione dei markers tumorali (MT), Aspetti applicativi e Nuovi marcatori tumorali; Michele Quaranta e Carla Lasalandra hanno curato i capitoli: Ruolo di alcuni marcatori tumorali nello screening per la diagnosi precoce dei tumori ed infine Angelo Paradiso con Annalisa Chiriatti e Gerolmina Florio hanno curato il capitolo: Fattori prognostico-predittivi nel carcinoma della mammella.

Sergio Rassu

L'evoluzione dei markers tumorali (MT)

Dalle origini…

Alcune pubblicazioni, anche molto recenti (1, 2), hanno ripercorso dalle origini la storia dei MT: ad esse faremo riferimento per dare avvio alla prima parte di questa pubblicazione.

L'uso di specifici esami di laboratorio applicati all'Oncologia Clinica risale ormai a diversi decenni. Anzi, quello che viene considerato in assoluto il primo marcatore tumorale (3), la **proteina di Bence-Jones**, risale addirittura alla metà del XIX secolo (4). Da allora la formazione di un grossolano precipitato, costituito da quelle che molto più tardi saranno identificate come catene leggere di immunoglobuline monoclonali, nelle urine acidificate e riscaldate ha rappresentato un fondamentale test diagnostico per il mieloma multiplo.

Successivamente, attraverso un lungo arco di tempo, altre sostanze che in determinate situazioni possono rientrare nella categoria dei marcatori tumorali, come spie della presenza di una neoplasia nell'organismo ospite, vengono individuate, con test biologici o tecniche biochimiche tradizionali, tra gli **ormoni** e gli **enzimi** (ad es. la gonadotropina corionica HCG (5) e l'ormone adrenocorticotropo ACTH (6, 7), la fosfatasi acida prostatica PAP (8) e l'enzima glicolitico lattato-deidrogenasi LDH ed i suoi isoenzimi (9), ecc.).

Da ricordare, anche, l'avvio dell'analisi cromosomica dei tumori, che porta all'identificazione del cromosoma Philadelphia, associato alla leucemia mieloide cronica (10).

Lo studio sistematico dei MT circolanti comincia, comunque, negli anni '60 (Tabella 1), grazie agli iniziali progressi compiuti nel campo dell'immunologia dei tumori, che elabora in quel periodo il concetto degli "antigeni tumore-associati" (TAA) (11,12). In particolare, notevole interesse suscitano i cosiddetti "antigeni tumorali embrio-fetali", quale espressione della parziale dedifferenziazione della cellula tumorale, che pare ripercorrere a ritroso il cammino dell'ontogenesi (13). Vengono identificati, così, alcuni marcatori fondamentali, come l'**Alfa-fetoproteina (AFP)** (14), l'**Antigene Carcinoembrionale (CEA)** (15) e l'**Antigene Polipeptidico Tissutale (TPA)** (16). Per la loro "scoperta" si seguono due percorsi sperimentali opposti: da una parte la ricerca del marcatore organo-specifico o presunto tale (ad es. il CEA per il carcinoma del colon) e dall'altra quella dell'antigene tumorale comune (TPA).

Anche in questo caso occorrerà attendere diverso tempo per chiarire,

Anno	Autore	Evento
1846	Bence-Jones	Proteina di Bence-Jones
1930	Zondek	HCG
1938	Gutman & Gutman	PAP
1957	Bjorklund	TPA
1960	Yalow & Berson	Tecnica RIA
1963	Abelev	AFP
1965	Gold &Freedman	CEA
1968	Miles & Hales	Tecnica IRMA
1969	Huebner & Todaro	Oncogeni
1971	Addison & Hales	Tecnica IRMASandwich
1971	Engvall & Perlman	Tecnica ELISA
1975	Kohler & Milstein	Mo Abs
1976	Watson	Primo esempio di FPIA
1978	Schroeder & Yeager	Primo esempio di LIA
1979	Koprowski	CA19.9
1979	Wang	PSA
1981	Bast	CA125
1984	Kufe e Hilkens	CA15.3
1985	Mullis	Tecnica PCR
1989	Slamon	HER-2 / neu
Fine anni ’80		
Inizio anni ‘90	Ekins e Fodor	Prime ricerche sui Micro-array
1991	Stenman e Lilja	Forme molecolari del PSA
1991	Smith	RT-PCR per mRNAcellule
tumorali		
1993	Stamey e Vessella	PSA ultrasensibile
1993	Rivista “Science”	p53 – Molecola dell'anno
1994	Folkman e Fidler	Angiogenesi
1996	Minna & Gazdar	Ricerca Traslazionale
1996	Rosemberg	Evidence – Based Medicine
1996	AA.VV.	Proteomica
2000	Human Genoma Project	
	Celera Genomics	Sequenziamento Genoma Umano
2001	AA.VV.	Era Post-Genomica

Tabella 1. Principali tappe cronologiche nello sviluppo del dosaggio dei Markers Tumorali.

almeno in parte, il significato biologico di questi marcatori entrati nella pratica clinica (17): il CEA, quale membro della superfamiglia delle immunoglobuline, implicato nei processi di riconoscimento ed adesione intercellulare (18); l'AFP con una funzione di proteina di trasporto, in grado di legare gli estrogeni (19) e gli acidi grassi insaturi e forse con un ruolo immuno-soppressivo (20) ed il TPA, quale componente del citoscheletro e più precisamente espressione di una miscela delle tre citocheratine (CK 8, 18 e 19) più rappresentate negli epiteli umani (21). Più recentemente, il CEA (22) ed il TPA (23) sono stati associati, sulla base di esperienze condotte in linee cellulari tumorali, anche al processo di apoptosi. In effetti, un nuovo interessante metodo quantitativo di misurazione dell'apoptosi nelle cellule epiteliali si basa proprio sul riconoscimento di un neo-epitopo della CK 18, esposto dopo clivaggio ad opera di alcune caspasi (Figura 1) (24).

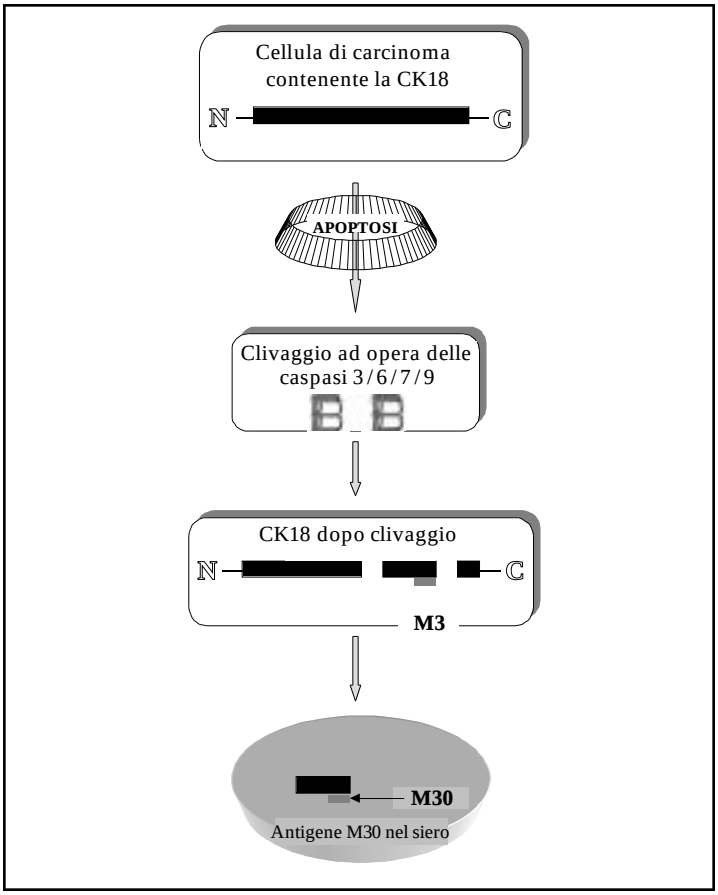

Figura 1. Formazione del neo-epitopo M30 della CK 18 durante l'apoptosi.

Fra le diverse tecniche di dosaggio immunologico all'epoca disponibili, la più adatta per sensibilità e specificità, risulta essere il **metodo radioimmunologico (RIA)**, messo a punto inizialmente da Yalow e Berson nel 1960 per la determinazione dell'insulina plasmatica (25), che facilita grandemente la diffusione di questi test nella pratica clinica. Ad esso ben presto si affianca il **metodo immunoradiometrico (IRMA)** (26), che ha la prerogativa dell'impiego del reattivo anticorpale in eccesso e che riscuote subito notevole successo, soprattutto nella variante tipo "sandwich" (o a due siti) (27).

...al passato prossimo...

Sul piano tecnologico, però, la più importante conquista è rappresentata sicuramente dall'introduzione nel 1975, grazie alla tecnica degli ibridomi, degli **Anticorpi Monoclonali (MoAbs)** (28), che hanno consentito un notevole salto di qualità per tutta l'immunometria e ne costituiscono ancora oggi strumento indispensabile. Questa scoperta, infatti, ha sia migliorato le performance dei MT già noti, sia ne ha ampliato le conoscenze, come nel caso dei marcatori citocheratinici, con l'introduzione successiva di TPS, CYFRA 21.1, TPA-M, TPA-cyk (29-32) (Tabella 2) e, soprattutto, ha aperto la strada per l'individuazione di sempre nuovi biomarcatori.

La famiglia più numerosa di nuovi marcatori che vengono così identificati è quella dei **markers mucinici**, che annovera importanti componenti, come il **CA125**, il **CA15.3**, il **CA19.9** (33-36), oltre a molti altri (Tabella 3).

Le mucine sono glicoproteine ad elevato P.M., caratterizzate dalla presenza di legami O-glicosidici e dotate di elevata densità e viscosità. Sono costi-

Denominazione	Anno	CK identificate	Anticorpo di cattura	Anticorpo marcato
TPA policlonale	1957	8, 18, 19	Policlonale	Policlonale
TPA monoclonale	1994	8, 18, 19	3 Monoclonali	Policlonale
TPS	1989	18 (epitopo M3)	Policlonale	Monoclonale M3
CYFRA21.1	1992	19	Monoclonale KS19-1	Monoclonale BM19-21
TPA cyk	1992	8, 18	2 Monoclonali	Policlonale

Tabella 2. Caratteristiche degli immunodosaggi sierici per le Citocheratine (CK).

Antigene	Immunogeno	Anticorpo Monoclonale
CA125	Linea cellulare di carcinoma ovario	OC125
CA19.9	Linea cellulare di carcinoma del colon	1116NS 19-9
CA15.3	- Membrane dei globuli rossi del latte umano	
	- Metastasi di carcinoma mammario	115D8
		DF3
MCA	Linea cellulare di carcinoma mammario	b12
CA549	- Membrane dei globuli rossi del latte umano	
	- Linea cellulare di carcinoma mammario	BC4E549
		BC4W154
CA27.29	Mucina estratta da asciti umane	B27.29
TAG72	- Metastasi di carcinoma mammario	
	- Estratti da carcinoma mammario	B72.3
		CC491116
CA195	Estratti da carcinoma del colon	CC3C195
CA50	Linea cellulare di carcinoma del colon	C50
CA242	Linea cellulare di carcinoma del colon	C242

Tabella 3. Principali marcatori mucinici disponibili per test di laboratorio.

tuite da uno scheletro proteico (apomucina), a cui sono attaccate numerose catene oligosaccaridiche, che possono arrivare a costituire fino all'80% dell'intera molecola (37). Abitualmente, le mucine rivestono gli epiteli, formando il muco, quel gel protettivo che fornisce una difesa nei confronti di microrganismi, agenti fisici, sostanze tossiche e variazioni di pH. Alcune evidenze sperimentali suggeriscono che le mucine svolgano anche altre funzioni oltre a quelle di semplice protezione; sembrerebbe, infatti, che possano avere un ruolo importante nei meccanismi di crescita neoplastica, favorendo l'invasività e la metastatizzazione (38,39).

Nelle neoplasie si verifica un sovvertimento architettonico del tessuto, che determina un'inversione della polarità funzionale ed un più ampio contatto delle cellule tumorali con i vasi neoformati, per cui si ha una notevole secrezione di mucine direttamente nel torrente sanguigno, con aumento dei livelli circolanti di questi markers in diverse neoplasie (40).

Anche il 1979 rappresenta una data importante perché è l'anno in cui viene purificato l'**antigene prostatico specifico (PSA)** (41), destinato a diventare quello che oggi viene considerato per la sua rilevanza clinica il miglior MT disponibile, avendo rivoluzionato l'approccio al carcinoma prostatico (42).

Il PSA, dal punto di vista biochimico, è un enzima del tipo delle proteasi

seriniche, appartenente alla famiglia delle callicreine tissutali umane (43) (Tabella 4), che fisiologicamente servirebbe a mantenere fluido il liquido seminale, garantendo la mobilità e vitalità degli spermatozoi nel processo di fecondazione (44). In virtù della sua elevata specificità tissutale per la prostata, utilizzato insieme alle indagini clinico-strumentali (come l'esplorazione rettale e l'ecografia trans-rettale), permette all'urologo di fare molto bene sia la diagnosi che il monitoraggio del carcinoma prostatico. Per quest'ultimo, soprattutto grazie alle metodiche ultrasensibili di dosaggio del PSA(45), che consentono di determinare anche concentrazioni bassissime del marcatore. Con l'obiettivo di migliorare ancora l'aspetto diagnostico sono state via via sviluppate diverse procedure derivanti dal PSA (Tabella 5) ed, infine, si resta in attesa di conoscere le risultanze dei trial controllati in corso, sia negli USAche in Europa, sull'uso del PSAnello screening del carcinoma della prostata (54).

Nome	Espressione principale	Gene	N° aminoacidi	Sito catalitico
hK1	Pancreas, gh. salivari, rene	Cromosoma 19	238	His41, Asp96, Ser189
hK2	Prostata	Cromosoma 19	237	His41, Asp96, Ser189
hK3 o PSA	Prostata	Cromosoma 19	237	His41, Asp96, Ser189

Tabella 4. Principali esponenti della famiglia delle callicreine tissutali umane (hK).

Procedura statica (1° tipo)	Anno	Autore
PSA-Density	1989 / '92	Benson (46)
Ratio PSA Free / Totale	1991	Stenman (47) – Lilja (48)
Range normalizzati per età	1993	Oesterling (49)
Isoenzimi del Free-PSA	1995	Huber (50)
Dosaggio diretto del PSAcomplessato	1998	Allard & Zhou (51)
Procedura dinamica (2° tipo)	**Anno**	**Autore**
PSA-Velocity	1992	Carter (52)
Tempo di raddoppiamento del PSA	1993	Schmid (53)

Tabella 5. Procedure diagnostiche derivate dal dosaggio del PSA per la diagnosi del carcinoma prostatico.

Nel corso degli anni '80 e della prima metà degli anni '90, tenuto conto anche di un periodo più o meno lungo per ciascun marcatore tra i primi studi e l'applicazione clinica, si assiste alla grande diffusione dei MT, come attestato tra l'altro dal progressivo incremento del numero di pubblicazioni sull'argomento (3) e dal fatto che in molti laboratori si crea un settore dedicato ai MT, nell'ambito dell'immunometria.

Diversi fattori promuovono questo vasto successo dei MT, tra cui sicuramente, a parte la sempre maggiore rilevanza epidemiologica, clinica e sociale acquisita dalla patologia neoplastica, l'elevata accettabilità da parte dei pazienti. Infatti, rispetto ad altre indagini più invasive, si preferisce sottoporsi ad un prelievo di sangue, anche in modo ripetuto nel tempo, per seguire l'andamento della malattia, con l'acquisizione di un segnale quantitativo, relativamente preciso, spia a distanza del tumore primitivo e delle sue metastasi ed a costi abbastanza contenuti, soprattutto se confrontati con quelli di alcune metodiche strumentali.

Contemporaneamente, si assiste in campo tecnologico allo sviluppo delle tecniche di dosaggio alternative al RIA, che utilizzano **traccianti non isotopici (enzimatici, fluorescenti e, soprattutto, chemiluminescenti)** (55-57). Tra questi ultimi ricordiamo: il luminolo ed i suoi derivati, i diossetani, gli esteri di acridinio, usati sia da soli che abbinati a marcatori enzimatici (perossidasi, fosfatasi alcalina) e, nella variante dell'elettrochemiluminescenza, il rutenio-tris (bipiridina). Verso queste metodiche, che non presentano i vincoli della radioattività, si orienta progressivamente la preferenza delle aziende del settore e degli utilizzatori, con lo sviluppo di strumentazioni aventi un grado di automazione crescente, che consentono dosaggi sensibili, precisi e con tempi di esecuzione molto contenuti, alla portata praticamente di qualsiasi laboratorio. Il continuo perfezionarsi delle tecniche e delle apparecchiature immunometriche ci porta fino ai giorni nostri, con il consolidamento insieme ai MT di altri test che condividono questo tipo di dosaggio, come ormoni, markers virali, farmaci e droghe, ecc., su strumenti completamente automatici ad accesso random.

Inoltre, nello stesso periodo, occorre almeno segnalare, benché non rientrino strettamente nella nostra trattazione, anche le importanti applicazioni dei MT nel campo dell'immunoistochimica e dell'immunoscintigrafia.

...sino ai giorni nostri.

Nel corso degli anni '90 altri due aspetti fondamentali segnano l'evoluzione cronologica dei MT.

Il primo è rappresentato dagli enormi **progressi nel campo della biologia cellulare dei tumori**, sia a livello della crescita tumorale, che della metastatizzazione. Oncogeni ed oncosoppressori, citochine, fattori di crescita,

markers di apoptosi, trasduttori del segnale, molecole di adesione, fattori angiogenetici, proteasi (Tabella 6), ecc. sono i vari concetti che in questo periodo la ricerca oncologica inizia a mettere a fuoco per la risoluzione dello stesso problema. Si cerca in questo modo di esplorare tutta la storia naturale del tumore, scomponendola in diverse tappe successive da percorrere passo passo, sempre più approfonditamente. Senza dimenticare, tuttavia, che come accade molto spesso in biologia bisogna tener conto soprattutto dell'equilibrio fra fattori contrapposti (58): oncogeni ed onco-soppressori, fattori proliferativi ed apoptosi, proteasi ed anti-proteasi, fattori angiogenetici ed anti-angiogenetici (Tabella 7), ecc. Nello stesso tempo l'interazione fra le diverse componenti di un processo, realmente unitario *in vivo* e solo artificiosamente scomposto per le necessità dei ricercatori, come ad esempio fra attività proteolitica ed angiogenesi (59), rende ancora più complessa l'analisi.

Proteasi	**Classe**	**Materiale prevalentemente usato per il dosaggio**
Catepsina D	Aspartica	Tessuto
Catepsine B, H, L	Cisteinica	Siero, plasma, tessuto
PSA	Serinica	Siero
MMPs 2, 9	Metallo	Siero, plasma
uPA, tPA	Serinica	Tessuto

MMPs: Matrix metalloproteinases
uPA: Attivatore urinario del plasminogeno o urochinasi
tPA: Attivatore tissutale del plasminogeno

Tabella 6. Principali proteasi studiate in campo oncologico.

Attivatori	**Inibitori**
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	Trombospondina
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	Endostatina
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	Angiostatina
Angiogenina	
Pleiotrofina	

Tabella 7. Regolatori circolanti dell'angiogenesi.

Il concetto di "**ricerca traslazionale**", definito come il processo di trasferire scoperte del Laboratorio in interventi clinici per la diagnosi, il trattamento, la prognosi o la prevenzione delle malattie, con un diretto beneficio per la salute umana (60), introdotto in Medicina in questo periodo, può trovare un tipico esempio proprio nel tentativo di estrapolare dalla ricerca di base nuovi markers per la pratica clinica, su basi più razionali.

In questo senso, alcuni promettenti risultati sono già stati ottenuti, come nel caso di: Proteasi, HER2/neu, VEGF, ecc. Infatti, se i markers tradizionali rappresentavano un epifenomeno dello sviluppo tumorale (61), questi nuovi marcatori risultano direttamente implicati nei diversi momenti patogenetici della neoplasia. Quindi, possono significare anche nuove possibilità di approccio all'uso dei MT (62), oltre al monitoraggio della malattia, spaziando dalla fase diagnostica a quella terapeutica, come ad esempio si può ipotizzare, riferendosi ai markers citati poco prima, con l'uso di inibitori delle metallo-proteasi (tipo batimastat e marimastat) (63), di anticorpi monoclonali umanizzati (tipo Herceptin) (64) e molecole anti-angiogenetiche (tipo endostatina) (65).

Contemporaneamente, grazie ai progressi compiuti in generale nel campo della genetica, con la centralità acquisita dallo studio del genoma umano (nel 1989 prende il via ufficialmente il **Progetto Genoma Umano**), anche in campo oncologico l'attenzione dei ricercatori si sposta sempre più sul materiale nucleare. Riprendendo le pionieristiche ipotesi sugli oncogeni di Huebner e Todaro (66) e sviluppando il concetto che la trasformazione maligna di una cellula è causata dall'accumulo di alterazioni in classi specifiche di geni, in virtù anche della disponibilità di nuove tecnologie: dalle sonde genetiche (67) alla PCR (68), si raggiungono rapidamente risultati importantissimi. Dal gene onco-soppressore Rb del retinoblastoma (69) alla sequenza di alterazioni genetiche, associate alla transizione dall'epitelio normale al cancro colo-rettale metastatico, proposta da Vogelstein (70), dalla p53, proclamata nel 1993 molecola dell'anno dalla rivista Science (71), ai geni di suscettibilità al cancro, come gli ormai famosi BRCA1 e 2 (72). Naturalmente, anche in questo settore si aprono grandi prospettive dal punto di vista terapeutico (terapia genica) (73).

Nell'ambito delle più recenti applicazioni delle tecniche di biologia molecolare allo studio dei MT, vanno considerati altri due aspetti di particolare interesse: la misurazione dell'attività telomerasica e la ricerca diretta in circolo o nei tessuti degli mRNAdi diversi marcatori mediante PCR.

La **telomerasi** è una ribonucleoproteina ad attività enzimatica, che permette la sintesi de novo delle estremità telomeriche dei cromosomi (74). I telomeri sono delle strutture specializzate poste alla fine dei cromosomi eucariotici, formate da sequenze nucleotidiche ripetute (TTAGGG), che svolgono un ruolo essenziale nel mantenere la stabilità del cromosoma. La lun-

ghezza dei telomeri si riduce progressivamente ad ogni ciclo replicativo, mentre la telomerasi agisce aggiungendo nuovo materiale telomerico alla fine dei cromosomi: dal bilancio fra questi due processi è determinato il numero di volte che la cellula può dividersi prima di morire (orologio mitotico) (75). La maggior parte dei tumori umani ed alcune lesioni pre-neoplastiche, come anche alcuni tipi di tessuti ad alta proliferazione, conservano questa attività telomerasica, al contrario delle cellule somatiche normali (76). Ciò suggerisce che la stabilità dei telomeri possa favorire le cellule tumorali, proteggendole dalla senescenza replicativa e contribuendo a conferire loro la capacità proliferativa indefinita che caratterizza il fenotipo maligno (immortalizzazione). Il metodo tradizionale di determinazione dell'attività telomerasica, detto TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol Assay) è piuttosto indaginoso, pertanto recentemente ne sono state proposte diverse varianti, tra cui particolarmente vantaggiosa è risultata quella di PCR-ELISA (77) . La misurazione della telomerasi potrebbe avere un ruolo diagnostico e prognostico in diverse neoplasie ed anche risvolti in campo terapeutico (78).

A partire dal primo studio di Smith del 1991 (79), l'**applicazione della tecnica di RT-PCR alla rivelazione delle cellule tumorali** nel sangue periferico o in altre sedi, mediante ricerca dell'mRNA, ha aperto la strada a nuove possibili applicazione dei MT nella diagnostica molecolare.

Infatti, si tratta di una metodica estremamente sensibile, perché almeno teoricamente basterebbe una sola cellula a dare il segnale sufficiente (80) ed è quindi capace di individuare già poche cellule tumorali circolanti nel sangue o situate come micrometastasi a livello linfonodale, di midollo osseo, ecc. In effetti, i lavori pubblicati nel corso di questi anni indicano proprio, insieme al perfezionarsi della tecnica (81-83), l'ampliarsi delle possibili applicazioni in fase diagnostica, di stadiazione prognostica, di risposta alla terapia, di valutazione della malattia residua e di follow up in numerose neoplasie. Tra i MT utilizzati con maggiore frequenza possiamo ricordare: l'enzima tirosinasi, espresso esclusivamente dai melanociti e quindi marker del melanoma, il PSA ed il PSMA per il carcinoma prostatico, le citocheratine CK 20 e CK 19 per diversi cancri epiteliali (mammella, vescica, colon, ecc.), il CEAper i tumori del tratto gastroenterico e l'AFP per l'epatocarcinoma (84-88) (Tabella 8).

Non tutti i problemi sono stati, però, risolti in termini di sensibilità e quantificazione del dato, di specificità, di standardizzazione ed affidabilità della metodica e di dimostrazione del reale significato clinico di poche cellule tumorali (89-92). Ad esempio, è stato osservato che il rilascio delle cellule da parte del tumore primitivo può avvenire in modo intermittente e quindi va valutato su diversi campioni. Tutto ciò naturalmente obbliga a ricercare, mediante trial clinici su larga scala e rigorose verifiche di qualità, ulteriori conferme prima di introdurre nella pratica clinica queste indagini pur così promettenti.

Marcatore	Neoplasia	Materiale utilizzato	Applicazione
Tirosinasi	Melanoma	Sangue, Linfonodi	S, M, P
PSA / PSMA	Prostata	Sangue, Midollo Osseo, Linfonodi	S, M, P
CEA	Colon, Stomaco, Mammella, Polmone	*Sangue, Midollo Osseo, Linfonodi	S, M, P
CK19 / CK20	Mammella, Vescica, Colon	Sangue, Midollo Osseo, Linfonodi	S, M, P
AFP	Epatocarcinoma	Sangue, Midollo Osseo	M
Tireoglobulina	Tiroide	Sangue	M

PSMA: Prostate-Specific Membrane Antigen
S: Stadiazione
M: Individuazione di micrometastasi o cellule tumorali circolanti
P: Prognosi
**: Non microcitoma*

Tabella 8. Esempi di marcatori testati con la tecnica di RT-PCR per la ricerca dell'mRNA.

Per completare questo argomento ricorderò anche la segnalazione di DNA solubile circolante o nucleosomi nel sangue di pazienti con cancro (93,94).

Il conseguimento della iniziale mappatura del genoma umano (95) (da parte del consorzio Human Genoma Project e della Celera Genomics, che nel 2000 annunziano di aver completato il sequenziamento del genoma umano) rappresenta nello stesso tempo il culmine di queste indagini ed il punto di partenza sia per ulteriori più approfondite investigazioni, sia per riconsiderare tutte le conoscenze acquisite (96, 97). Si apre in questi termini quella che già viene definita come **era post-genomica** (98),con un ritorno, in modo critico, anche all'analisi delle diverse proteine e della loro funzionalità (proteomica) (99) (Figura 2).

Il campo della **proteomica**, recentemente in grande espansione, sviluppa su larga scala essenzialmente due filoni (100): l'identificazione di nuove proteine e la conoscenza della loro funzione, sia in condizioni normali che patologiche. Infatti, i dati ottenibili dalla sequenza genica da soli non ci fornisco-

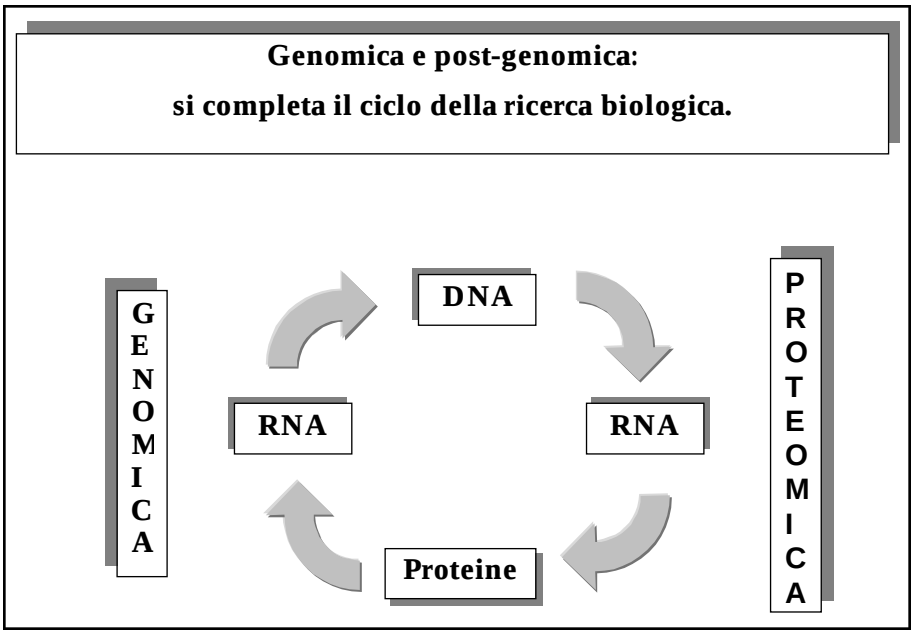

Figura 2. Complementarietà fra genomica e proteomica.

no elementi completi sulla funzionalità delle singole proteine o sul loro ruolo nelle malattie, importantissimi sul piano pratico. Un esempio chiarissimo di ciò si può estrapolare dalla metamorfosi del bruco in farfalla (101). Questi due stadi di sviluppo sono genotipicamente identici, ma differiscono profondamente nella rispettiva attività proteica, risultando in due esseri completamente diversi nell'aspetto. La proteomica rappresenta, quindi, il naturale complemento della genomica, fornendo informazioni sui livelli di espressione delle proteine, sulle modificazioni post-translazionali (come glicosilazione, fosforilazione e acetilazione) e sulle interazioni fra le diverse proteine o la formazione di complessi.

In queste nuove prospettive il supporto tecnologico è indispensabile e tale si propone soprattutto il settore dei **microarray** per analisi multiple di DNA, RNA o proteine (Tabella 9) (102-105) su chips, in quanto in grado di rivoluzionare le performance precedenti. Naturalmente, quello dell'oncologia è il campo principale di ricerca, in vista di possibili applicazioni per diverse neoplasie: mammella, prostata, ovaio, colon-retto, leucemie e linfomi (106-108).

L'altro aspetto pressante è quello della **razionalizzazione dell'uso dei MT**, e più in generale di tutte le indagini di laboratorio, in un'ottica sempre più attenta da un lato alla evidence based medicine (EBM) (109) e dall'altro al continuo ridimensionamento delle risorse.

Materiale studiato	Applicazione	Scopo
DNA	Genotipizzazione	Individuare gli alleli presenti in determinati loci
RNA	Profilo di espressione genica	Valutare i geni espressi in una determinata situazione
Proteine	Tipizzazione proteica	Studiare le proteine prodotte in condizioni normali e patologiche

Tabella 9. Classificazione dei Micro-array.

In generale si propugna il passaggio da una medicina fondata su intuito, tentativi ed errori, largo utilizzo di tecnologie, procedure diagnostiche e farmaci ad una sempre più incentrata su un numero limitato di interventi, di cui è scientificamente verificata l'efficacia.

Seguendo criteri di efficienza ed efficacia, vengono prodotti in tutto il mondo, con il contributo di molti ricercatori e delle società scientifiche, studi, manuali e linee-guida sull'uso corretto dei MT (110-112). Ad esempio, l'American Society of Clinical Oncology (ASCO), a partire dal 1996 emana delle **linee-guida** per l'uso nella pratica clinica dei MT nei carcinomi della mammella e del colon, con riferimento alla prevenzione, allo screening, al trattamento ed al follow-up (113). Le valutazioni si basano sulle pubblicazioni sull'argomento presenti in Medline dal Gennaio del 1989, ad opera di un panel di esperti che comprende oncologi medici, chirurghi oncologi, medici di laboratorio, esperti di economia sanitaria e di preparazione di linee-guida mediche ed anche due rappresentanti dei malati. Successivamente, queste linee-guida sono state aggiornate nel 1997 (114) e nel 2000 (115). Il dato emergente di un basso contributo pratico dei pur numerosi studi condotti sui MT, che non consentono di trarre prove sufficienti a raccomandarne l'uso in molti casi nella pratica clinica, spinge alla pubblicazione di un editoriale sul The International Journal of Biological Markers (116) su come redigere e revisionare nuovi articoli sui MT e sui criteri per impostare in modo appropriato il disegno degli studi clinici sui biomarkers, riprendendo anche i concetti espressi da Hayes et al. (117) circa la valutazione dell'utilità clinica dei MT e

la scala sviluppata dalla Canadian Task Force on the Periodic Health Examination (118) modificata (113). Il significato di queste linee-guida è peraltro chiaramente sottolineato nella versione 2000, che specifica testualmente: "è importante ricordare che queste linee-guida non possono sempre definire variazioni individuali fra pazienti. Esse non si propongono di sostituire il giudizio del medico rispetto al singolo paziente o a particolari situazioni cliniche e non possono considerarsi comprensive di tutti gli appropriati metodi di cura o esclusive di altri trattamenti ragionevolmente diretti ad ottenere gli stessi risultati. L'ASCO ritiene che l'aderenza a queste linee-guida debba essere volontaria" (115).

Altre linee-guida per i MT venivano frattanto prodotte dalla National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) (119) e dall'European Group on Tumor Markers (EGTM) (120) per un numero più ampio di neoplasie.

Come recentemente commentato da Caputo et al. in una interessante disamina pubblicata in italiano sulle linee-guida per il monitoraggio biochimico delle neoplasie (121), quelle dell'ASCO appaiono più orientate verso la clinica, mentre quelle dell'NACB più verso il laboratorio e quelle dell'EGTM si propongono una sorta di approccio intermedio. Anche in Italia già dal 1996, a conclusione del progetto finalizzato Applicazioni Cliniche della Ricerca Oncologica del CNR, nell'ambito del volume sulle "Basi scientifiche per la definizione di linee guida in ambito clinico per i tumori del colon-retto, della mammella, del polmone, della prostata, dell'utero e dell'ovaio" (122) venivano fornite utili indicazioni per l'uso corretto dei biomarcatori. Sempre in Italia, sviluppando l'esperienza del Comitato Nazionale per lo Studio dei Marcatori Tumorali della Società Italiana di Prevenzione, Diagnosi e Terapia dei Tumori (SIPDTT) (123), coordinato da Gian Luigi Buraggi prima e da Emilio Bombardieri poi dell'Istituto Nazionale Tumori di Milano, Massimo Gion pubblica un'ottima Guida all'uso clinico dei biomarcatori in oncologia (124), consultabile anche tramite internet e di cui è in corso di stampa una nuova edizione 2001. Lo stesso Gion svolge un'indagine conoscitiva presso una trentina di ospedali dell'Italia Settentrionale circa l'uso nella pratica clinica dei MT per il follow-up dei carcinomi mammario e colo-rettale (125), riscontrando un'ampia variabilità nel tipo e nel numero dei MT usati di routine, dei cut-off impiegati e delle decisioni cliniche prese in base ai risultati dei biomarcatori e rilevando in un'elevata percentuale di casi una mancanza di comunicazione tra clinici e laboratoristi. Sulla scorta di queste risultanze, stiamo svolgendo anche in Puglia una raccolta di dati presso laboratori pubblici e privati sull'attività e l'organizzazione nel settore dei MT (126). Per quanto riguarda il **Controllo Esterno di Qualità (VEQ)**, invece, dal 1984 è attivo in Italia quello per CEAed AFP, cui ha fatto seguito nel 1989 quello per CA19.9, CA125 e CA15.3, fino a giungere al 1991 per il PSAtotale e poi per il free-PSA (127). Con il passare degli anni si è assistito complessivamente ad

un incremento del numero dei partecipanti, alla disponibilità di più pannelli di MT ed ad un miglioramento delle performance analitiche. Tra l'altro va ricordato che a partire dal 1998 il Ministero della Sanità ha finanziato un Progetto di Ricerca per la costituzione di un Network sul Controllo di Qualità delle prestazioni del Laboratorio Oncologico, coordinato da Angelo Paradiso dell'IRCCS Oncologico di Bari e che dispone di un web site www.cqlaboncologico.it (128).

Nel campo più specifico della standardizzazione voglio solo ricordare i progressi relativi al dosaggio del PSAnelle sue diverse forme, a partire dalla Seconda Conferenza di Stanford (129,130) fino ai primi standard WHO (131,132).

Per concludere questa parte, ritengo sia condivisibile quanto scritto recentemente da Sturgeon (133), riferendosi alla situazione inglese, per cui a fronte di un crescente numero di laboratori che dosano MT, la qualità del servizio si è mantenuta o è migliorata e deve far ben sperare per il futuro. La sfida che resta da vincere è quella di avvicinare sempre più le regole di corretto utilizzo alla pratica quotidiana di ciascun laboratorio: ma è una battaglia che i laboratoristi possono vincere solo insieme ai clinici.

Aspetti applicativi e nuovi marcatori tumorali

Per quanto riguarda le attuali applicazioni dei MT occorre innanzitutto insistere sul loro uso corretto, che deve includere:

1) richieste adeguate. Da questo punto di vista il Laboratorista, che purtroppo ha spesso un ruolo piuttosto indiretto nella pratica, deve cercare di sviluppare al massimo il dialogo con il clinico, in modo da orientarlo al meglio, sia relativamente al tipo di marcatore da adoperare, che sulle modalità d'uso. E' importante distinguere (124) i markers di prima scelta (sicuramente utili, per i quali esiste una solida letteratura, tale da garantire nell'utilizzo routinario un rapporto costo/risultato favorevole) da quelli di seconda scelta (probabilmente utili, per i quali ai dati sperimentali interessanti non fa riscontro una verifica clinica definitiva del rapporto costo/risultato. Inseriti in protocolli di valutazione clinica possono dare informazioni addizionali) e da quelli affini (appartenenti alla stessa famiglia biochimica di marcatori, dai quali ci si attendono prestazioni simili in una data patologia. Il loro uso in associazione è da escludere).

Altrettanto utile per il Laboratorista è ricevere, insieme alla richiesta, informazioni sulla storia clinica del tumore, sui trattamenti terapeutici pregressi o in corso, su eventuali manovre diagnostiche e su quant'altro possa influenzare i livelli dei marcatori (eventi fisiologici ed abitudini voluttuarie, patologie non tumorali concomitanti) per la migliore interpretazione del dato che si andrà ad ottenere. Infine, particolare cura sarà seguita nel verificare gli aspetti pre-analitici di accettazione, preparazione e conservazione del campione da parte del laboratorio.

2) assicurazione della qualità analitica del risultato. Nella Tabella 10 sono riportate le performance analitiche e cliniche caratteristiche dei test diagnostici *in vitro* (134), riferite nel nostro caso ai MT. Innanzitutto, occorre ricordare che il basso ordine di grandezza delle concentrazioni dei MT misurate (10^{-9} – 10^{-12} g) influenza la precisione del metodo. Pertanto, per valutare correttamente i dosaggi consecutivi di un marcatore bisogna considerare la precisione del metodo alla concentrazione in esame, tenuto conto che la ripetibilità è generalmente più scarsa ai livelli bassi ed elevati. L'altro aspetto da tenere presente, che influenza l'accuratezza dei dosaggi, è legato al tipo indiretto di misurazione dei MT, come confronto di immunoreattività per analogia con una curva standard, con tutti i limiti che ciò comporta. Anche perché,

Caratteristiche Analitiche	Caratteristiche Diagnostiche
- Sensibilità	- Sensibilità
- Specificità	- Specificità
- Precisione	- Efficienza
- Accuratezza	- Valore Predittivo

Tabella 10. Performance analitiche e chimiche dei test di laboratorio.

a parte il PSA, a cui si è già fatto cenno, solo per CEA, AFP, HCG e Tireoglobulina esiste uno standard internazionale (e non tutti i metodi commerciali sono calibrati contro lo standard internazionale disponibile). Da questa mancanza di riferimenti assoluti nasce la necessità per valutare correttamente dosaggi ripetuti di un marker di conoscere lo standard usato o il tipo di kit commerciale utilizzato, rivolgendosi possibilmente sempre allo stesso laboratorio o a laboratori confrontabili. Naturalmente, rientra nella corretta prassi di laboratorio monitorare costantemente la qualità dei dosaggi effettuati, anche attraverso la partecipazione attenta a Programmi di Controllo della Qualità. Nel caso dei MT, proprio la mancanza in molti casi di standard internazionali e le differenze tra kit commerciali utilizzati, a cui si accennava, rendono particolarmente importante questo aspetto. L'uso dei marcatori nel monitoraggio dei pazienti obbliga a stabilire se eventuali variazioni riscontrate fra prelievi successivi dello stesso paziente hanno reale significato clinico o meno: a tal fine, è indispensabile conoscere la variabilità analitica e biologica del dosaggio. L'effetto gancio, infine, è un aspetto comune agli immunodosaggi, ben noto a tutti i Laboratoristi. Sicuramente, l'automazione sempre più spinta, fino ad inglobare anche le fasi pre-analitiche (automazione completa), con una più stretta collaborazione fra ditte produttrici e laboratoristi, sta contribuendo ad una sempre migliore standardizzazione di questi dosaggi.

3) refertazione completa. Deve risultare realmente utile al clinico, chiara ed esauriente (135). Ad esempio, obbligatoriamente dovrà riportare le caratteristiche delle metodiche utilizzate dal laboratorio e le eventuali variazioni nel tempo, per quanto detto al punto 2). L'interpretazione clinica del risultato, soprattutto quando si disponga di più prelievi seriati nel tempo dello stesso paziente, rappresenta il momento fondamentale della collaborazione tra laboratorista e clinico. I concetti di cut-off, livelli decisionali e differenza critica vanno valutati nel loro reale significato. Da questo punto di vista un refe-

rente del laboratorio per i MT risulta particolarmente efficace, come anche poter sfruttare al meglio i supporti informatici oggi disponibili. Ad esempio, per riportare su un unico referto i diversi prelievi effettuati nel tempo dallo stesso paziente, in modo da seguire l'andamento del marcatore nel tempo. Inoltre, come anche espresso a livello internazionale (136), ogni laboratorio dovrebbe calcolarsi per ciascun marcatore i propri intervalli di riferimento su una popolazione sana, distinguendo per sesso, età ed abitudini di vita (es. fumo) e non attenersi semplicemente all'inserto del kit o ai dati della letteratura. Ancora, la valutazione di più prelievi seriati nel tempo dello stesso paziente, per identificare le variazioni significative, va fatta secondo criteri empirici e matematici (124):

- tre o più incrementi (o decrementi) successivi consecutivi
- variazione di più del 50% nei confronti del prelievo precedente
- variazione superiore alla differenza critica (calcolata secondo la formula di Fraser (137)).

Le opportunità di utilizzo dei MT nella gestione clinica del paziente oncologico sono numerose.

Se da una parte è vero che l'imponente letteratura sui MT, soprattutto in passato, ha trascurato il fatto che la reale rilevanza clinica di molti markers proposti era modesta (121), anzi ha agito spesso da fattore confondente per le pur utili applicazioni (110), che non vanno sottovalutate; è altrettanto vero che negli ultimi anni l'interesse per i biomarcatori si è riacceso per diverse motivazioni (116), soprattutto legate a nuove possibilità terapeutiche.

Ancora oggi la più comune applicazione è quella nel **monitoraggio** della malattia dopo la terapia primaria, in cui la persistenza di livelli elevati del marker suggeriscono la possibile presenza di malattia occulta, residua o disseminata, mentre una loro riduzione al di sotto dei livelli iniziali testimonia la radicalità del trattamento terapeutico. A questa si aggiunge la valutazione dei MT nel follow-up dei pazienti trattati ed apparentemente liberi da malattia: incrementi delle concentrazioni del marcatore possono costituire un segno di ripresa della malattia, che talvolta può precedere anche di diversi mesi l'evidenza clinico / strumentale di malattia. In questi casi, con il progredire delle modalità di trattamento, è probabile che l'identificazione precoce delle recidive potrà risultare sempre più utile, in termini di sopravvivenza e qualità della vita di questi pazienti.

Strettamente collegato è anche l'uso dei MT nel monitoraggio della terapia per la malattia metastatica, in cui la loro esecuzione seriata può fornire un'indicazione precoce della risposta agli agenti chemioterapici.

Il dosaggio dei MT al **momento della diagnosi** del tumore primitivo serve per avere un valore basale di riferimento prima della terapia, per avere indicazioni indirette sull'estensione della malattia, in quanto i livelli ematici del marcatore sono generalmente correlati alla massa del tumore, per avere

in certi casi indicazioni circa l'istotipo del tumore e per avere indicazioni prognostiche aggiuntive.

Quest'ultima applicazione dei MT merita sicuramente di essere particolarmente sviluppata in futuro; infatti, poiché la **prognosi** di un paziente ne indica la previsione di sopravvivenza, indipendentemente dal trattamento, l'importanza dei fattori prognostici in oncologia è legata all'identificazione di quei pazienti che non risponderanno al trattamento standard e che quindi vanno indirizzati a terapie più aggressive.

Analogamente, la possibilità di utilizzare i MT per **individuare la terapia farmacologica migliore** per un dato paziente rappresenta un altro campo molto importante di potenziale sviluppo dei markers, soprattutto in rapporto all'introduzione di sempre nuove sostanze antitumorali. La possibilità di migliorare la risposta da parte del paziente e di eliminare la morbidità e la spesa derivanti da un trattamento inefficace costituiscono dei target particolarmente rilevanti. L'esempio maggiormente conosciuto di marcatori in grado di indirizzare la scelta della terapia farmacologia nei tumori è rappresentato dalle proteine recettoriali per gli estrogeni e per il progesterone. Un altro marcatore più recentemente studiato per questo genere di applicazione è l'**HER-2/neu**, sul quale brevemente ci soffermeremo.

L'HER-2/neu è un oncogene, localizzato sul cromosoma 17q, che codifica per un recettore transmembrana di un fattore di crescita, avente un peso molecolare di 185.000 (p185). Appartiene alla stessa famiglia del recettore dell' EGF (epidermal growth factor) o erbB-1 ed è anche denominato erbB-2.

La proteina completa consiste di 3 porzioni: una interna citoplasmatica ad attività tirosinochinasica, una corta porzione idrofobica transmembrana ed una porzione extracellulare altamente glicosilata, che viene rilasciata in circolo, con un P.M. tra 97 e 115 (138).

Differenti metodi sono stati usati per analizzare sia il gene HER-2/neu che la sua proteina in diversi tumori solidi e soprattutto nel carcinoma della mammella. I più adoperati sono stati quello di fluorescent in situ hybridization (FISH) per studiare l'amplificazione dell'oncogene e quello immunoistochimico per analizzare l'overespressione della proteina p185, che è stato anche approvato dall'FDA. Per quanto riguarda la determinazione dell'HER-2/neu circolante è oggi disponibile un metodo ELISA, anche in automazione, per dosarlo sia nel siero che nel plasma (139).

L'HER-2/neu risulta amplificato nel 25-30% di carcinomi mammari ed overespresso nel 20-40% di donne con ca. primitivo della mammella. L'HER-2/neu circolante è elevato nel 5-15% di donne con tumore mammario primitivo e nel 50-70% di quelle con cancro metastatico.

La grande importanza dell'HER-2/neu deriva dalla recente disponibilità di una terapia innovativa, basata sull'uso di un MoAb umanizzato diretto contro questo recettore, denominato Trastuzumab (Herceptin) (140), appro-

vato nel 1998 dall'FDA per il trattamento del ca. mammario metastatizzato. Inoltre, le pazienti che overesprimono l'HER-2/neu presentano una prognosi peggiore, a ridotta sopravvivenza, con malattia più aggressiva. Anche la terapia ormonale e la chemio risentono dell'espressione dell'HER-2/neu, poiché le donne che esprimono di più il marcatore sono meno responsive al trattamento ormonale ed alla chemioterapia, con un maggior numero di forme resistenti.

La determinazione sierica dell'HER-2/neu, che dagli studi fin qui condotti sta confermando i dati tissutali (141), si propone quindi come un MT dalle grandi ed interessanti potenzialità applicative, capostipite della nuova linea di MT orientati verso la terapia.

Il campo che, comunque, in futuro potrà vedere il maggiore impegno nella ricerca dei MT probabilmente sarà quello degli **screening** per una diagnosi sempre più precoce della malattia, quando le possibilità di successo terapeutico sono maggiori. A questo aspetto dedichiamo più avanti un breve capitolo, sviluppato da Michele Quaranta, sulle attuali conoscenze. I concetti generali che regolano attualmente queste ricerche sono (62): 1) lo screening tumorale non dovrebbe essere eseguito su tutta la popolazione, ma piuttosto su individui sintomatici o ad alto rischio; 2) la diagnosi precoce deve essere vantaggiosa dal punto di vista del rapporto costo-benefici; 3) deve avere un effetto sulla percentuale di successo terapeutico o sulla sopravvivenza.

Se fino ad oggi le possibilità in questo senso sono state molto limitate (ad es. determinazione della calcitonina nei consanguinei di pazienti con cancro midollare della tiroide) ed in corso di valutazione per alcune neoplasie (es. prostata, ovaio), c'è molta attesa per quanto si farà nei prossimi anni, soprattutto grazie ai progressi della diagnostica molecolare. Anche per quanto riguarda il carcinoma mammario (con le doverose cautele) sono in corso di valutazione molto preliminare il brex-test (142) e l'NMP66 (143).

A conclusione di questa parte, fra i tanti nuovi MT, che a testimonianza dell'interesse costante dei ricercatori per l'argomento, vengono proposti, ci soffermeremo brevemente solo su quelli relativi al **carcinoma prostatico**.

Infatti, sia a causa della rilevanza clinica di questa neoplasia, che è una delle più frequenti, in aumento negli ultimi anni, e, purtroppo, gravata complessivamente ancora da una elevata mortalità, che sulla spinta degli ottimi risultati ottenuti con l'impiego del PSA, si sono recentemente sviluppate intense indagini per identificare nuovi markers da affiancare al dosaggio del PSA totale e del free-PSA. Questi marcatori, pur avendo fornito all'urologo un notevole contributo, non risultano ancora completamente soddisfacenti, per il persistere di zone grigie nella diagnostica del ca. prostatico. I punti cruciali sono rappresentati da una diagnosi precoce della malattia e dalla diagnosi differenziale rispetto all'ipertrofia prostatica benigna. L'adenocarcinoma della prostata ha abitualmente un decorso indolente ed i sintomi clini-

ci possono manifestarsi solo quando la malattia è già localmente avanzata o metastatica. A questo punto, però, la malattia non è più curabile radicalmente, da cui consegue che solo una diagnosi più precoce può essere risolutiva. Nel contempo, il PSA è specifico per il tessuto prostatico, ma non per il cancro e quindi si pone il problema di una notevole sovrapposizione nella distribuzione dei valori di PSAfra individui con ipertrofia prostatica e carcinoma prostatico localizzato.

Dei numerosi marcatori proposti (144), con varia fortuna, oltre a quelli riportati nella Tabella 11, faremo riferimento solo a quelli più recentemente studiati.

Molecole di Adesione	E-selectine, ICAM1, VCAM1, N-CAM
Citocheratine	TPS
Fattori di crescita	bFGF, TGF-1, VEGF
Citochine	IL6
Fattori Neuroendocrini	Bombesina, Calcitonina, NSE, Cromogranina
Fattori Vasodilatativi	Endotelina1
Marcatori ossei	Fosfatasi alcalina ossea, Osteocalcina

Tabella 11. Altri markers tumorali studiati nel carcinoma prostatico.

Partendo proprio dal PSA, sono stati individuati:

- una forma tronca del precursore del PSA (145), identificata da estratti di tumore prostatico;
- il dosaggio diretto del PSA complessato (cPSA), principalmente con l'alfa1-chimotripsina (146);
- il dosaggio del PSA complessato all'alfa2-macroglobulina, dopo immunoassorbimento e denaturazione (147);
- il dosaggio degli isoenzimi del free-PSA(148, 149).

Seguendo, invece, delle strade indipendenti sono stati identificati:

- la prostasina, che è una serino-proteasi espressa essenzialmente dalle cellule dell'epitelio prostatico. Sarebbe implicata nella biologia della prostata normale, con la capacità di sopprimere l'invasione di linee cellulari di ca.prostatico (150). E' stata anche proposta recentemente come marker per identificare con RT-PCR le cellule prostatiche circolanti in pazienti con neoplasia prostatica (151);

- l'Hepsina e la pim-1 kinasi (107), selezionate attraverso la tecnica dei microarrays dei cDNA, dai profili di espressione genica di più di 50 campioni di tessuto prostatico normale e tumorale e delle 3 più comuni linee cellulari di cancro prostatico;
- e, soprattutto, la **callicreina 2 (hK2**= human glandular kallikrein 2).

L'hK2 ed il PSA(anche noto come hK3) sono entrambi membri della famiglia delle callicreine, che fino a poco tempo fa contava solo tre elementi (Vedi Tabella 4), mentre oggi ne sono stati identificati almeno 15, i cui geni sono tutti situati sul cromosoma 19 (152). Di questi nuovi componenti, la hK4 o prostase (153) e la hK6 (154) vengono già studiate per una possibile applicazione in oncologia.

Ritornando all'hK2, è una serino-proteasi, come il PSA, con il quale condivide un'ampia identità della sequenza amino-acidica, pari all'80% (155). Entrambi sono altamente espressi nel tessuto prostatico e secreti normalmente nel liquido seminale, dove la concentrazione dell'hK2 è 100 volte più bassa di quella del PSA. Anche nel siero la callicreina 2 ha una concentrazione 30-100 volte inferiore al PSA. Come il PSA, l'hK2 forma complessi con diverse anti-proteasi, tuttavia, solo il 5-10% dell'hK2 circolante è legata agli inibitori e per il resto è libera (156).

Il ruolo biologico dell'hK2 non è ancora ben noto; si sa che è sotto il controllo androgenico ed attiverebbe sia il pro-PSA, che lo zimogeno dell'urochinasi, come anche sarebbe in grado di degradare le Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs), aumentando la biodisponibilità degli IGFs (insulin-like growth factors), importanti regolatori della crescita delle cellule prostatiche normali e tumorali (157). Studi di immunoistochimica hanno dimostrato un comportamento della callicreina 2 differente rispetto al PSA, con una espressione più intensa nei tumori ad alto grado e nelle metastasi linfonodali, ma più bassa nell'ipertrofia.

Recentemente, sono stati messi a punto metodi per il dosaggio sierico della callicreina 2, in particolare dell'hK2 totale (libera più legata all'alfa1-antichimotripsina, ACT), superando le difficoltà legate alla cross-reattività ed alla concentrazione inferiore rispetto al PSA(156,158). La callicreina 2 sierica risulta aumentata nei pazienti con carcinoma prostatico rispetto ai soggetti normali (159), ma più che usata singolarmente l'hK2 sarebbe utile soprattutto in combinazione con il PSA, totale e free (160).

Infatti, dai primi risultati (160) sembrerebbe aumentare sia la specificità che la sensibilità di questi due markers nella diagnostica del ca. prostatico, potendo contribuire a ridurre il numero delle biopsie non necessarie (161) ed a migliorare la diagnosi precoce, anche con livelli di PSA al di sotto dei 4 ng/mL (160, 162). In questo senso sono stati valutati anche i ratio hK2/free-PSA e hK2 x (PSAtotale/free PSA).

Inoltre, un'altra applicazione vantaggiosa dell'hK2 sarebbe quella nella

stadiazione del carcinoma prostatico, per discriminare le forme confinate all'organo da quelle localmente avanzate (163,164). Questo dato avrebbe importanti conseguenze cliniche, ad esempio nel trattamento chirurgico nerve-sparing (164).

Infine, anche per l'hK2 è stato messo a punto un metodo di RT-PCR per l'identificazione dell'mRNA nel sangue periferico (165) per lo staging molecolare della neoplasia della prostata.

Saranno gli studi futuri su ampie casistiche, se ben condotti (116), a stabilire la reale utilità nella pratica clinica anche di questo MT.

Ruolo di alcuni marcatori tumorali nello screening per la diagnosi precoce dei tumori

Premessa

I temi analizzati in questo capitolo non si esauriranno in una successione di schede concepite allo scopo di fornire le nozioni fondamentali sui marcatori tumorali, né tantomeno di definire il loro "stato dell'arte", ma indicheranno le attuali linee di ricerca e le prospettive future di queste molecole. Il contenuto, infatti, è dedicato a chi desidera utilmente avvantaggiarsi dei costanti aggiornamenti sulla materia presentati dalla letteratura scientifica e vuole essere anche di supporto per il medico e per il paziente. Abbiamo scelto a tal proposito un taglio di approccio immediato grazie ad un linguaggio chiaro e semplice , presentando le acquisizioni più recenti sui markers tumorali e sul loro utilizzo nello screening per la diagnosi precoce di alcune neoplasie.

La necessità di anticipare la diagnosi delle patologie neoplastiche necessita infatti l'individuazione di un piano idoneo di screening. A tal fine le cossidette "campagne di azione preventiva", di documentata efficacia,devono soddisfare i seguenti requisiti:

1. la malattia da ricercare deve essere frequente per incidenza e mortalità;
2. devono essere disponibili test di screening accurati nel diagnosticare la malattia in fase iniziale, attuabili e accettabili dal paziente;
3. trattamenti efficaci devono essere disponibili quando la malattia è diagnosticata in fase pre-clinica (166).

Oggi il nuovo impegno nella lotta contro il cancro si basa appunto sull'identificazione precoce della malattia attraverso regimi di screening specifici.

Se si realizzassero questi programmi in maniera efficace, potremmo contribuire sicuramente a ridurre l'incidenza e la mortalità della patologia tumorale ed a migliorare la sopravvivenza e la qualità della vita del paziente neoplastico (167). Lo screening è consigliato particolarmente per ricercare una malattia con significativa morbilità e mortalità come il cancro attraverso test mirati in gruppi di popolazione senza sintomi a maggiore probabilità di contrarre il tumore; questo sembra essere il presupposto fondamentale per la diagnosi precoce.

Infatti in questi gruppi di soggetti selezionati ad alto rischio soprattutto

per storia familiare, le campagne di screening consentono una maggiore possibilità di anticipare la diagnosi dei tumori (166).

I markers tumorali normalmente sono utilizzati per confermare la diagnosi di tumore, come fattori prognostici, nel monitoraggio dei trattamenti terapeutici e nel follow-up della neoplasia (Tabella 12).

· SCREENING

· DIAGNOSI

· PROGNOSI E STADIAZIONE

· TRATTAMENTO E MONITORAGGIO

· FOLLOW-UP

Tabella 12. Utilizzo clinico dei Marcatori Tumorali.

Il loro dosaggio sierico assume un ruolo sempre più decisivo nella stadiazione e nell'evoluzione delle patologie tumorali (Tabella 13).

Inoltre alcuni marcatori trovano oggi utile applicazione nello screening per la diagnosi precoce del cancro (Tabella 14). Infatti la diagnosi precoce diventa essenziale nella fase pre-clinica del tumore, allorché in assenza di sintomatologia si può intervenire ancora con successo.

· **SCREENING PER CARCINOMA PROSTATICO**

- *PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN (PSA)*

Tabella 13. Utilizzo clinico dei Marcatori Tumorali.

· **PROGNOSI E STADIAZIONE**	
- AFP	*EPATOCARCINOMA*
- CA125	*CARCINOMA OVARICO*
- PSA	*CARCINOMA PROSTATICO*
- S.O. (SANGUE OCCULTO)	*CARCINOMA DEL COLON*

Tabella 14 . Utilizzo clinico dei Marcatori Tumorali.

Ed è proprio questa la finalità dei protocolli di screening e cioè quella di diagnosticare il cancro nella fase tecnicamente chiamata pre-clinica. D'altronde il tempo impiegato dal tumore per passare dalla sua comparsa biologica alla sua fase clinica rappresenta un intervallo in cui si può attuare in maniera efficace la diagnosi precoce (168) (Figura 3.).

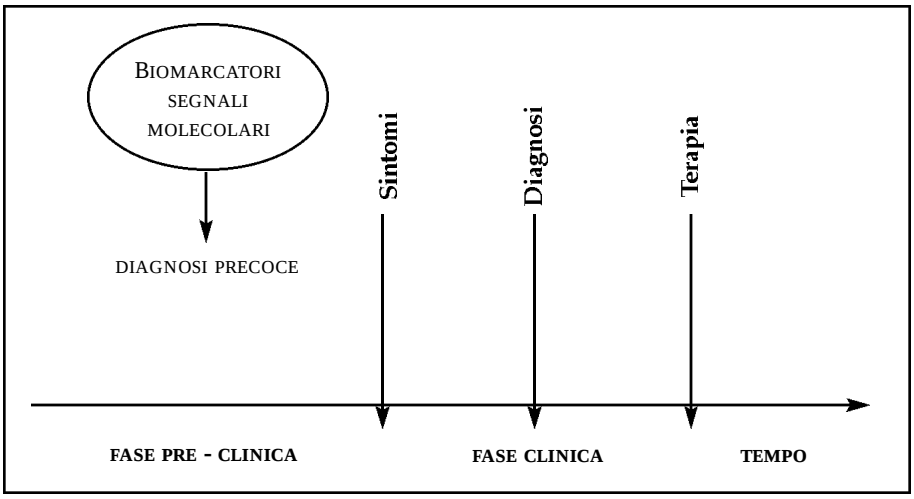

Figura 3. La progressione del cancro.

Per questo oggi, la rilevanza clinica dei Marcatori Tumorali circolanti è correlata alla precocità con la quale sono capaci di rilevare un determinato fenomeno clinico (169). D'altro canto però bisogna registrare che a seguito del continuo aggiornamento delle conoscenze scientifiche si è verificata una

crescente disponibilità di biomarcatori che spesso sono stati utilizzati impropriamente da parte della classe medica nelle varie fasi delle malattie neoplastiche. Di qui la necessità di procedere anche per i markers tumorali alla accuratezza dei metodi di analisi adottati e alla appropriatezza clinica di utilizzo.

Alla luce di queste considerazioni, oggi esistono criteri specifici per l'utilizzo dei marcatori tumorali sierici in funzione del tipo e dello stadio del tumore. Per questo oggi alcune di queste molecole vengono utilizzate nello screening per la diagnosi precoce.

Negli Stati Uniti ad esempio è in corso un "cancer screening trial" denominato PCLO (Prostate, Colon-rectum, Lung, Ovary) presso il National Cancer Institute di Bethesda. Questo trial consiste in un programma di screening per la diagnosi precoce dei tumori della Prostata, Colon-Retto, Polmone, Ovaio.

In questo studio vengono utilizzati alcuni marcatori tumorali e in particolare il PSA per il carcinoma della prostata, il S.O. per la diagnosi precoce del colon e il CA125 per il carcinoma dell'ovaio, mentre per la diagnosi precoce del tumore polmonare viene utilizzata la TAC spirale (170).

Nello studio sono entrati fino ad oggi 155.000 uomini e donne tra i 55 e i 74 anni provenienti da 10 aree geografiche diverse degli Stati Uniti. Lo scopo è di verificare se questi test di screening possano ridurre l'incidenza e la mortalità di questi tumori. E' un trial condotto sulla popolazione apparentemente sana che ha per obiettivi la prevenzione I° e II° delle suddette neoplasie, la diagnosi, il trattamento, l'impatto con la malattia e le strategie per migliorare il comfort e la qualità di vita dei pazienti.

Il trial prevede una visita iniziale e le indagini sopra indicate vengono eseguite ogni anno per 3 anni; i ricercatori saranno in continuo contatto con i partecipanti allo studio per ulteriori 10anni dal loro ingresso nel trial. La partecipazione è facoltativa e tutti coloro che decidono volontariamente di farparte del programma possono ritirarsi in ogni momento. I tutors dei trial in corso analizzano le informazioni ricevute dai partecipanti in ogni momento e allorché evidenziano un particolare beneficio bloccano lo studio e lo rendono disponibile a tutta la popolazione; lo stesso avviene quando non viene rilevata alcuna utilità per i partecipanti allo studio.

Da quanto espresso, appare utile sottolineare l'attivazione di studi multicentrici pilota; ma non tutti concordano che si possa ridurre la mortalità del cancro attraverso programmi di screening, su quale possa essere il migliore regime di screening da adottare, quale debba essere l'età per l'inclusione nello screening e quale intervallo di rescreening debba essere applicato (171).

I pro e i contro di un programma di screening saranno di seguito analizzati nel corso di questo studio che ha per scopo la conferma della utilità, per altro già validata, anche nella diagnosi precoce di alcune neoplasie.

Ruolo del PSA nell'anticipazione diagnostica del carcinoma della prostata

Negli ultimi anni il cancro della prostata è diventato un problema di salute mondiale. Negli Stati Uniti e in molti paesi occidentali rappresenta la neoplasia più diffusa e la seconda causa di morte negli uomini e le previsioni future non sono assolutamente incoraggianti: si pensa infatti che nei prossimi 20 anni la mortalità possa triplicarsi.

Un lavoro pubblicato su Cancer nel Novembre1997 conferma il PSA l'unico marcatore da utilizzare routinariamente nei pazienti con patologia prostatica e il marker biologico più adoperato non solo per lo screening, ma anche per la stadiazione, il monitoraggio e il follow-up dei pazienti affetti da carcinoma prostatico (172).

Lo screening e la diagnosi precoce rappresentano i migliori trattamenti offerti per sperare nella soluzione di questa malattia e lo studio di Catalona et.al del 1991 (173) indica possibile la diagnosi precoce del carcinoma prostatico solo attraverso un regime di screening basato sul livello sierico del PSA (Tabella 13).

Il dosaggio del PSA sierico infatti, risulta di indiscussa utilità nei pazienti per modulare l'esecuzione di esami strumentali correlando fedelmente con il decorso della malattia.

La valutazione delle procedure di screening illustrate in un protocollo di studio randomizzato europeo sullo screening del cancro della prostata ha poi stabilito l'uso del cut-off del PSA sierico di 3-4 ng/ml, un valore di riferimento principalmente utilizzato per discriminare i soggetti sani da quelli con carcinoma prostatico, evidenziando l'organo-specificità dell'enzima ma non la sua cancro-specificità.

I risultati di questo studio sono stati pubblicati su UROLOGY nel 2001 (174). Comunque anche per il PSA, come per tutti i marcatori tumorali, si pone il problema della specificità in quanto valori moderatamente elevati di PSA si possono associare anche a patologie non neoplastiche; infatti elevate concentrazioni di PSA si osservano anche nelle iperplasie prostatiche benigne e prostatiti acute croniche. In particolare nel range di 4-10 ng/ml (la cosiddetta zona grigia) si avrebbe la maggiore sovrapposizione dei valori di soggetti con ipertrofia prostatica e carcinoma prostatico; per questo il rapporto tra PSA libero e totale risulta importante, poiché nei pazienti con neoplasia prostatica è ridotto rispetto ai pazienti con ipertrofia prostatica (175); questo consente che molti soggetti con iperplasia benigna e con valori di PSA appena al di sopra del cut-off siano inutilmente sottoposti a biopsia prostatica (176).

Il PSA nel siero esiste in forme molecolari diverse e la misura di queste forme offre nuove possibilità per migliorare la discriminazione diagnostica tra il carcinoma della prostata e l'iperplasia prostatica benigna. Nel circolo sanguigno, il PSAsi trova prevalentemente nella forma "free" (libera) e nella forma complessata e inoltre la misura del free-PSA e l'uso del rapporto con quello totale è ben stabilito in numerosi protocolli clinici.

Recentemente è stato evidenziato che nelle diverse situazioni cliniche cambiano i rapporti tra le diverse forme molecolari del PSA. L'obiettivo è quello di rivedere tutte le forme molecolari del PSA nel siero e nel tessuto e calcolare la loro utilità clinica. Altri membri della famiglia delle serin-proteasi potrebbero rappresentare possibili nuovi marcatori per la diagnosi precoce, avvalorando in questo modo la valenza scientifica di una review del 2000 pubblicata su Cancer Epidemiology Biomarkers e Prevention (177).

Lo sviluppo di nuovi markers molecolari e la possibilità di differenziare la malattia aggressiva da quella meno aggressiva, può aiutare i clinici ad evitare la biopsia in uomini che hanno basso rischio di contrarre il cancro della prostata (172). Ci sono 3 stadi da seguire per uno screening selettivo del carcinoma prostatico:

a. Selezionare gli uomini da sottoporre allo screening
b. selezionare gli uomini test-positivi da sottoporre alla biopsia
c. selezionare i tumori confermati per indirizzarli verso le migliori terapie (171).

Il valore del free-PSA dovrà essere calcolato più frequentemente insieme a dati clinici e di laboratorio più specifici per valutare il rischio di contrarre tale patologia. La decisione degli urologi a diminuire le biopsie sulla base del valore del free-PSA non ha effetto negativo sulla sicurezza del paziente.

C'è stato poi uno studio definito "Uroscreening" che rappresenta in campo urologico il primo studio osservazionale multicentrico condotto sull'intero territorio italiano. Questo progetto ha visto l'impegno di numerosi urologi per un periodo di due anni. Hanno aderito all'iniziativa 45 centri di urologia in tutta Italia arruolando 866 pazienti di età compresa tra 50 e 80 anni portatori di sintomi urinari persistenti e di una iperplasia prostatica benigna diagnosticata con l'esplorazione digito-rettale. L'obiettivo è stato quello di valutare il grado di correlazione tra sintomatologia di iperplasia prostatica benigna e qualità della vita (178).

Il progetto ha confermato che ad una condizione socio-economica più elevata si associa una sintomatologia meno evidente. La necessità di implementare la diagnosi e uno schema di follow-up, monitorando il livello del PSAnel paziente affetto da carcinoma prostatico, è fondamentale per ridurre il rischio di contrarre il carcinoma della prostata (171).

Ruolo dell'αFP nell'anticipazione diagnostica del carcinoma del fegato

La eterogenea distribuzione geografica dell'epatocarcinoma è probabilmente relativa alla differente prevalenza dei fattori di rischio nelle diverse aree del mondo. Studi epidemiologici dimostrano ad esempio, che i principali fattori di rischio dell'epatocarcinoma sono l'età, il sesso maschile, le epatiti croniche e la cirrosi da virus B, C e/o da alcool.

In accordo con i dati relativi all' aumento dell'incidenza nel mondo dell'epatocarcinoma, ci sembra ragionevole incrementare l'applicabilità dei programmi di screening per la diagnosi precoce di questa patologia. La finalità di questi programmi è di ridurre anche in questo caso l'incidenza e la mortalità della malattia e migliorare la sopravvivenza e la qualità della vita dei soggetti affetti, sebbene non esistono dati che confermino i reali benefici riguardo la sopravvivenza di tali individui.

Questi pazienti potrebbero beneficiare di un protocollo di screening rivolto a rispettare alcuni criteri che dovrebbero essere soddisfatti. Tutti i programmi di sorveglianza adottati per la diagnosi precoce dell'epatocarcinoma sono indirizzati verso una popolazione a rischio ben selezionata e usano la concentrazione di un marker tumorale chiamato alfa feto proteina a 6 mesi di intervallo tra un dosaggio e l'altro; l'αFP è un marker non del tutto specifico ma che attualmente risponde meglio di altri a una prima diagnosi della malattia.

Come linea di base tutti i pazienti sono esaminati attraverso analisi convenzionali biochimiche includendo il dosaggio sierico di questo biomarcatore (alfafetoproteina) e l'ecografia epatica. Un sospetto di epatocarcinoma si solleva una volta valutato un nodulo epatico maggiore di 10 mm attraverso ecografia o attraverso un significativo incremento di αFP.

I pazienti che presentano un nodulo epatico minore di 10 mm sono seguiti per 3 mesi per valutare la crescita eventuale futura del tumore o per monitorare la stabilità del nodulo. Una volta diagnosticato lo sviluppo del tumore attraverso l'incremento della concentrazione sierica del marcatore, il carcinoma del fegato viene confermato da indagini aggiuntive. Alcuni autori hanno suggerito che i pazienti cirrotici con persistenti elevati livelli di alfafetoproteina nel siero o con displasia cellulare del fegato in tessuto cirrotico,sono ad alto rischio di sviluppare il cancro del fegato e che questi soggetti oggi potrebbero beneficiare di un protocollo di screening.

Infatti in accordo a quanto detto, nei paesi occidentali i programmi di screening di base potrebbero essere condotti in pazienti cirrotici. Di contro l'uso di programmi di screening in pazienti non cirrotici non guiderebbe

verso potenziali benefici.

Si ritengono la resezione chirurgica e il trapianto del fegato le prime linee di opzione per l'epatocarcinoma nonostante non si conosca ancora qual è il miglior approccio rispetto al management standard di questa neoplasia, così come è dimostrato da uno studio recente di J. M. Lliovet "*Early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma*" .

Oggi circa il 25% dei pazienti può beneficiare di questi protocolli di prevenzione e di screening e il risultato finale potrà rilevare solo conquiste incoraggianti. Infatti nel progetto sopra citato, condotto su larga scala da più autori, si evince che la diagnosi precoce dell'epatocarcinoma è l'unica opzione efficace per aumentare le aspettative di vita di coloro che ne sono affetti, proprio perché i trial clinici sui metodi di trattamento adottati per pazienti con tumore avanzato non hanno dimostrato alcun risultato positivo di sopravvivenza (179).

Ruolo del CA 125 nell'anticipazione diagnostica del carcinoma dell'ovaio

Il cancro dell'ovaio è una malattia difficile da gestire e purtroppo infausta perché raramente diagnosticata in fase precoce ma molto spesso in fase tardiva, quando cioè le possibilità di cura non sono sempre vincenti (180-181).

Una buona tecnica di screening potrebbe ridurre i casi di diagnosi in stadio non precoce (fase clinica) e allungare i tempi di sopravvivenza delle pazienti (182). Sfortunatamente l'assenza di un'identità precisa della neoplasia rende "virtualmente" impossibile lo sviluppo di un'efficace tecnica di screening routinaria.

Uno sguardo agli aspetti clinici, patologici,epidemiologici e molecolari del cancro ovarico provvede a facilitare la conoscenza di questa neoplasia. Età avanzata e fattori relativi a incessanti ovulazioni, menarca precoce, menopausa tardiva, assenza di gravidanza o gravidanze eccessive, hanno dimostrato aumentare la possibilità di sviluppare il cancro dell'ovaio. Il lavoro principale da fare è quindi quello di individuare le donne ad alto rischio e rendere pronti test di screening e di diagnosi precoce dalle modalità di esecuzione e trattamento più efficaci.

Lo screening attraverso il livello sierico di CA125 e l'ecografia trans-vaginale suggerisce risultati promettenti evidenziando delle strategie che devono essere sviluppate ancora meglio per la prevenzione e la diagnosi precoce e che servono a controllare il processo della malattia (183).

Da tempo ormai, sostanziali progressi sono stati fatti nella conoscenza ma anche nei limiti dell'uso del CA125. Questo marcatore è maggiormente elevato nel cancro dell'ovaio ma può anche essere espresso in un numero di patologie ginecologiche non neoplastiche (endometriosi) e nelle patologie neoplastiche non ginecologiche (cancro della mammella, colon, polmone, pancreas).

La diagnosi precoce per il carcinoma dell'ovaio è cruciale per la donna in quanto aumenta la sopravvivenza a 5 anni. Come da lavoro pubblicato su International Journal Biological Markers del 1998 (184), per il monitoraggio del cancro dell'ovaio la migliore applicazione stabilita, resta il dosaggio sierico del CA125.

Comunque oggi l'uso dei markers tumorali sierici per la diagnosi del cancro dell'ovaio è stato limitato, in quanto hanno una bassa sensibilità e specificità per la l'analisi iniziale e in più un basso valore predittivo (185). I ricercatori hanno focalizzato la loro attenzione su una serie di markers complementari per migliorare l'approccio allo screening.

Per esempio l'HER2/neu, membro della famiglia degli EGF (epidermal growth factor), è overespresso anche nel 25-30% dei ca. ovarici e dati significativi rilevati da uno studio di Karlan BY infatti confermano un ruolo sostanziale e importante dell'HER2/neu anche nella fisiopatologia del cancro ovarico (186).

Gli studi concernenti i lavori sui markers interessati al cancro dell'ovaio (CA125, CA19.9, CEA, TPA, TPS) sono oggi ampiamente utilizzati per il management delle pazienti con tale patologia. Alcuni di questi marcatori sono utilizzati come risposta al monitoraggio della terapia. Lo studio di queste molecole biologiche, comunque, deve guidare verso una migliore conoscenza delle caratteristiche del cancro dell'ovaio (183). Infatti dal lavoro pubblicato su Cancer da Berek JS e Bast Jr, si evince che una migliore sensibilità e specificità della diagnosi precoce del carcinoma ovarico si ottiene con la misura combinata di più markers tumorali in aggiunta al CA125 (185).

Un procedimento che misura i markers sierici complementari potrebbe essere usato come tecnica primaria di screening facendola seguire da un'ecografia trans-vaginale. Sono state prese in considerazione le seguenti problematiche: 1) con la bassa prevalenza di carcinomi ovarici, un test di screening dovrebbe richiedere un 99.6% di specificità per realizzare un valore predittivo positivo di malattia; 2) non esiste un trattamento efficace per gli stadi avanzati, esistono solo risultati di prolungata sopravvivenza anche se gli screening del cancro dell'ovaio hanno bisogno di essere investigati in modo controllato per determinare una migliore sopravvivenza della malattia.

Nelle donne giovani i disordini ginecologici non maligni causano un aumento aspecifico dei markers tumorali (infiammazioni, endometriosi, miomi) (187). Oggi la posizione sia medica che della comunità è quella di

incrementare la diagnosi precoce del cancro di qualunque tipo che automaticamente conferirebbe beneficio e che dovrebbe essere realizzata nella fase pre-clinica della malattia.

Comunque si profila sempre più una scienza emergente di screening che offra approcci più rigorosi. Usando questi approcci, i metodi di diagnosi precoce per il cancro dell'ovaio non potrebbero incontrare che un più forte livello di evidenza (188). Oggi la maggior parte degli screening si basano appunto sull'ecografia trans-vaginale e sulle fluttuazioni seriche del CA125.

In risposta all'urgente bisogno di migliorare la diagnosi del cancro dell'ovaio, le ricerche includono studi di ibridazione differenziali tra l'epitelio ovarico maligno e quello normale per definire in modo univoco un antigene specifico del cancro ovarico.

Studi multistituzionali sono indicati per determinare se lo screening potrebbe causare un significativo decremento della mortalità da cancro dell'ovaio. L'uso del CA125 per la diagnosi precoce del cancro dell'ovaio è particolarmente indicato nelle donne in post-menopausa.

La mortalità del cancro dell'ovaio è diminuita pochissimo nonostante il crescente interesse da parte di tutta la classe medica ad incrementare i programmi di screening.

Tuttavia poter beneficiare di questi programmi per intervenire tempestivamente nella fase pre-clinica del tumore diventa necessario per sperare in un buon risultato finale. Negli ultimi anni, la misura dei markers sierologici ha avuto un'elevata influenza sia nella diagnosi in fase precoce che nel follow-up di alcune neoplasie corrispondenti. (Tabella 15).

Le informazioni derivate da questi studi sui marcatori riaprono la strada verso strategie di trattamento più precise convalidando l'utilità di queste molecole anche nel monitoraggio del tumore (Tabella 16). Resta l'efficace utilità della singola misura del CA125 come marker tumorale d'elezione, in combinazione all'ecografia trans-vaginale, nella diagnosi precoce del Ca ovarico (189).

· **FOLLOW-UP**
- PSA
- CA125
- AFP

Tabella 15. Utilizzo clinico dei Marcatori Tumorali.

· **TRATTAMENTO E MONITORAGGIO**
- PSA
- CA125
- AFP

Tabella 16. Utilizzo clinico dei Marcatori Tumorali.

Ruolo del s.o. (sangue occulto) nelle feci nell'anticipazione diagnostica del carcinoma del colon-retto

Nei paesi della Comunità Europea oggi si contano circa 130.000 nuovi casi di carcinoma colon-rettale.

In Italia i casi di recente diagnosi sono aumentati e la sopravvivenza non presenta grandi percentuali numeriche, soprattutto se la malattia ha già metastatizzato (170). Alla luce delle sopraccitate realtà epidemiologiche, e in considerazione di uno studio randomizzato condotto nel Massachusetts dal 1975 al 1993 su 46445 soggetti tra maschi e femmine costituiti da un gruppo sottoposto a screening annuale, un gruppo a screening biennale e un gruppo controllo, definiamo come unica strategia di screening di primaria importanza per la diagnosi precoce del colon-retto, il test per la ricerca del sangue occulto nelle feci.

Sono stati riscontrati 417 carcinomi nei soggetti sottoposti a screening annuale, 435 nei soggetti a screening biennale e 507 nei gruppi di controllo. I partecipanti allo studio non avevano diagnosi iniziale di carcinoma colon-rettale e sono stati seguiti attraverso un follow-up durato 18 anni.

In seguito poi ai primi valori minimi di positività al test di alcuni pazienti, quest'ultimi sono stati indirizzati alla colonscopia e radiografia dell'intestino con mezzo di contrasto. I risultati di tale ricerca sono stati pubblicati sul The New England Journal of Medicine di Novembre 2000 (190) e hanno permesso infatti di affermare che, anche se al momento non esistono i presupposti per proporre un unico modello di screening per il carcinoma del colon,

il test del S.O. rappresenta uno strumento di screening senza dubbio più efficace nella diagnosi preventiva di tale patologia, fungendo così da vero e proprio marcatore tumorale nella valutazione del tumore in questione.

Questo studio dimostra che lo screening del carcinoma del colon-retto con la ricerca del S.O. determina una riduzione della mortalità di questa malattia come evidente conseguenza della diagnosi precoce. Lo screening in questione consente un ulteriore beneficio: la riduzione dell'incidenza del carcinoma del colon-retto risultante dalla scoperta e dalla rimozione di lesioni pre-neoplastiche come i polipi adenomatosi.

Il test del S.O. nelle feci non è in realtà molto sensibile per la presenza di polipi ma può diagnosticare alcuni polipi di grandi dimensioni i quali sanguinano molto più frequente e si trasformano in cancro. In definitiva questo studio supporta la teoria della sequenza adenoma-carcinoma ed enfatizza la diagnosi e resezione degli adenomi avanzati attraverso la ricerca del sangue occulto nelle feci.

Le conclusioni di tale ricerca convincono che l'uso della ricerca del S.O. e la colonscopia riducono significativamente l'incidenza del cancro al colon ma rimangono comunque da chiarire i reali vantaggi dello screening sulla mortalità e sopravvivenza di questa malattia.

Fattori prognostico-predittivi nel carcinoma della mammella

Introduzione

Il carcinoma della mammella rappresenta la più frequente neoplasia maligna fra le donne, con il 18% di tutti i cancri femminili. Nonostante i programmi di screening abbiano incrementato la probabilità di scoprire questa malattia precocemente, il 10% circa delle pazienti viene diagnosticato ancora con malattia in stadio avanzato (191).

Nel caso di malattia localizzata ed in fase operabile, l'eventualità è quella di effettuare, dopo la chirurgia radicale una terapia adiuvante o precauzionale volta a ridurre la probabilità di eventuali ricomparse del tumore (192). Attualmente, la programmazione di una terapia adiuvante si basa sulla attenta valutazione del rischio di ripresa della malattia, sull'efficacia e sul profilo di tossicità delle varie terapie essenzialmente costituite da farmaci ad azione ormonale e chemioterapici. Risulta quindi cruciale in detta programmazione individuare i sottogruppi di pazienti a probabile diversa prognosi e responsività alla terapia.

Numerose caratteristiche cliniche, patologiche e biomolecolari tumorali sono state di volta in volta proposte come rilevanti nel "decision making process" per pazienti affette da ca. mammario operabile. A questo proposito è opportuno distinguere l'informazione di significato prognostico che per definizione permette di meglio prevedere l'andamento clinico della malattia (intervallo libero, sopravvivenza globale, sopravvivenza dalla ricaduta) in assenza di (o indipendentemente da) terapie adiuvanti sistemiche. In questa categoria, ricadono generalmente informazioni relate con l'aggressività della malattia quali le caratteristiche tumorali espressione di differenziazione tumorale, di velocità di crescita, di invasività, di metastatizzazzione. Da queste si distinguono gli indicatori predittivi di risposta ai trattamenti (tipo di risposta clinica, durata della risposta) solitamente espressione di caratteristiche cellulari tumorali direttamente relate ai meccanismi di azione di specifici farmaci.

La esigenza del clinico di disporre di fattori prognostico-predittivi sempre più precisi ha portato nell'ultimo decennio allo studio di una serie di caratteristiche tumorali di cui si è verificato il valore clinico. Nel 1992, McGuire (193) ha descritto una serie di criteri che devono essere soddisfatti per ritenere come di rilevanza clinica uno specifico fattore prognostico-predittivo; le

caratteristiche del biomarcatore che devono essere soddisfatte sono: la rilevanza biologica nel processo di progressione neoplastica; la riproducibilità interlaboratorio delle tecniche utilizzate per la sua determinazione; la rilevanza clinica verificata in studi prospettici; il valore clinico indipendente da altri fattori; la utilizzazione di valori cut-offs verificati in studi confirmatori.

In particolare, McGuire (193) sottolineava il rilievo clinico che poteva assumere la disponibilità di fattori che permettessero di identificare sottogruppi di pazienti a particolare buona prognosi da non candidare a trattamenti sistemici.

Schematicamente, ed in accordo con la comunità scientifica internazionale, gli indicatori sia prognostici che predittivi possono essere raggruppati in diverse categorie:

1. fattori clinico-patologici essenzialmente indicatori di estensione e di morfologia cito-istologica della malattia;
2. fattori biologici del tumore comprendenti indicatori di ormonosensibilità, proliferazione cellulare ed invasività;
3. fattori bio-molecolari espressione di alterazioni di espressione e/o molecolari di oncogeni o geni oncosopressori.

FATTORI CLINICO-PATOLOGICI

Sicuramente le comuni caratteristiche patologiche tumorali quali la dimensione tumorale, la presenza o meno di metastasi linfonodali al momento della chirurgia radicale e/o di metastasi a distanza rappresentano i fattori prognostici meglio conosciuti e di maggiore rilevanza clinica. Di utilizzo routinario nella pratica clinica da ormai alcuni decenni, rappresentano informazioni indispensabili per una corretta pianificazione terapeutica.

Dimensioni del tumore

Il diametro patologico del tumore mammario primitivo al momento della prima diagnosi rappresenta un forte fattore prognostico di ricorrenza di malattia e di sopravvivenza globale peraltro indipendente dalle altre informazioni clinico-patologiche del tumore. La probabilità di sopravvivenza per pazienti con diametro tumorale <1cm è infatti globalmente di circa il 98%, probabilità che scende al 89% per tumori con diametro compreso tra 1 e 3 cm ed arriva al 85% per quelle con diametro tumorale da 3 a 5 cm. (194). Il diametro tumorale è anche predittivo di presenza di metastasi linfonodali al momento della chirurgia.

Stato linfonodale ascellare

La presenza o l'assenza di metastasi ai linfonodi ascellari al momento della chirurgia radicale rappresenta per le pazienti con ca. mammario operabile un fattore prognostico di grande rilevanza per l'andamento clinico della

malattia. I dati del NASBP (194) dimostrano chiaramente una correlazione significativa tra numero di linfonodi metastatici e sopravvivenza con probabilità di sopravvivenza di circa il 90% per le pazienti linfonodi negativi rispetto al 80% delle pazienti con 1-3 linfonodi metastatici ed al 57% di quelle con >3 linfonodi. La probabilità di sopravvivenza scende infine a meno del 20% a 5 anni dalla chirurgia radicale per le pazienti con più di 10 linfonodi metastatici ascellari. Queste considerazioni di tipo prognostico si riferiscono comunque a pazienti che abbiano subito una dissezione ascellare totale al momento della chirurgia ed a linfonodi ascellari analizzati microscopicamente. Sono attualmente in corso studi per confermare la stessa valenza prognostica per le informazioni sullo stato linfonodale ascellare ottenute con tecniche chirurgiche meno invasive quale quella del linfonodo sentinella (195).

Grado di differenziazione cito-istologica

Come per molte altre neoplasie, anche per il ca. mammario il grado di differenziazione cellulare ed istologica viene determinato routinariamente. La sua definizione si basa su parametrici unicamente morfologici e pertanto la sua maggiore limitazione è rappresentata dalla scarsa riproducibilità interosservatore. La metodica più frequentemente utilizzata per la definizione del grading è rappresentata dalla classificazione di Scarff-Bloom-Richardson che prende in considerazione tre parametri: l'indice mitotico, il grado di differenziazione istologica del tessuto neoplastico ed il pleomorfismo nucleare. (196). Molti studi hanno dimostrato l'importanza prognostica del grado tumorale determinata secondo questa metodica nel predire la probabilità di ripresa della malattia.

FATTORI BIOLOGICI

Recettori per l'Estrogeno o Progesterone

E' stato chiaramente dimostrato da alcuni decenni che la cellula tumorale mammaria media la sensibilità ai farmaci ad azione antiestrogenica grazie alla presenza intracellulare di recettori per estrogeno (RE) e/o per il progesterone (PRg) che sono presenti in circa il 70% delle neoplasie. La loro presenza è stata analizzata sia come fattore di tipo prognostico che predittivo. Studi clinici controllati hanno inizialmente evidenziato una un maggior intervallo libero da malattia ed una maggior sopravvivenza a 5 anni dalla chirurgia radicale per le pazienti con tumore provvisto di RE (197). In studi successivi, dette differenze di andamento clinico della malattia non sono state confermate in studi che comprendevano pazienti con follow-up più lungo. In alcuni di detti studi, il vantaggio in termini di sopravvivenza libera da malattia e globale per le pazienti con tumore RE+ è risultato evidente soprattutto per quelle che avevano ricevuto un trattamento antiestrogenico.

Attualmente i Recettori per Estrogeno e Progesterone sono ritenuti clinicamente utili nel predire la risposta alla terapia endocrina. (198) La presenza contemporanea di RE e PgR nel tumore primitivo sembra garantire una probabilità di risposta algi antiestrogeni del 60-70% in confronto ad una probabilità del 10% che caratterizza le pazienti con tumore RE ed RPg negativo;una probabilità intermedia di risposta caratterizza invece le pazienti provviste solo di uno dei due recettori.

Convenzionalmente, per classificare la paziente come con ca. mammario provvisto o meno di recettori ormonali si utilizzano valori cut-offs positivo/negativo. Tuttavia, è necessario ricordare che la relazione fra la concentrazione di recettori e la probabilità di risposta alla terapia è di tipo continuo. La ormonoresponsività della malattia è quindi proporzionalmente maggiore all'aumentare dell'espressione del recettore.

I recettori possono essere determinati con metodo biochimico o immunoistochimico (199). Il metodo biochimico è più indaginoso e non può essere facilmente eseguito in neoplasie piccole (inferiori a 0.5 cm) ma consente valutazioni quantitative. Inoltre, è supportato da una verifica esterna di qualità (VEQ) internazionale, consolidata da oltre venti anni di attività. Il metodo immunoistochimico ha il vantaggio di una maggiore praticità può essere eseguito anche su sezioni istologiche contigue a quelle utilizzate per la diagnosi morfologica e pertanto trova particolare indicazione nei tumori di piccole dimensioni. Dati recenti sembrano indicare nelle paziente trattate con ormonoterapia adiuvante, una migliore predizione dell'efficacia del trattamento con la metodica immunoistochimica. Per contro, non esiste tuttora un'evidenza forte e consolidata da studi mono o multicentrici sul significato prognostico come variabile indipendente e pertanto è necessario rimarcare che lo stato recettoriale non deve essere usato come indicatore prognostico.

Inoltre, i risultati emersi da un programma pilota di Controllo di Qualità Nazionale per la determinazione immunoistochimica degli RE hanno evidenziato un'elevata variabilità dei risultati tra i diversi laboratori (www.cqlaboncologico.it). A questo proposito è necessario sottolineare che non esistono ancora in Italia programmi routinari di controllo esterno di qualità per la determinazione dei recettori endocrini. Tale situazione deve essere considerata transitoria. Infatti, la tendenza a portare le strutture sanitarie verso un controllo globale della qualità di processo attraverso certificazione ed accreditamento non può prescindere dalla valutazione esterna della qualità analitica. E' quindi opportuno considerare con cautela i risultati delle determinazioni immunoistochimiche, che dovrebbero possibilmente essere eseguite in centri di eccellenza.

Marcatori di proliferazione cellulare

Sin dagli anni 70, molti ricercatori avevano intuito come la velocità di cre-

scita della neoplasia potesse rappresentare un importante indice di aggressività non solo biologica ma anche clinica della malattia. Dopo aver utilizzato criteri anche clinici per valutare il tempo di raddoppiamento volumetrico della singola neoplasia, sono state messe a punto alcune tecniche laboratoristiche che permettono di caratterizzare molte caratteristiche della cinetica di proliferazione cellulare delle neoplasie umane (200). L'approccio cinetico da più lungo tempo utilizzato per studi di base e clinici è rappresentato dalla valutazione autoradiografica delle cellule che incorporano 3H-Timidina (TLI) ed è basato sulla capacità delle cellule che sintetizzano DNA di incorporare il precursore marcato. Dopo aver dimostrato come il TLI determinato sul tumore primitivo sia indipendente dalle dimensioni tumorali, dalla presenza o meno di metastatizzazione linfonodale loco-regionale mentre mostri una relazione con altre caratteristiche biologiche (recettori ormonali, ploidia) e morfologiche (grado di differenziazione cito-istologica), l'interesse dei ricercatori si è rivolto alla verifica del significato prognostico di detta informazione biologica.

Concordanti sono i risultati sul significato prognostico in pazienti con tumore N- sottoposte al solo trattamento loco-regionale. E' stato inoltre dimostrato che il TLI, fornisce informazioni prognostiche indipendenti da altre variabili cliniche (età) o patologiche (dimensioni del tumore) e biologiche (200,201).

Più recentemente la disponibilità di anticorpi ha dato avvio a determinazioni immunoistochimiche per la identificazione di marcatori antigeni nucleari di proliferazione. Tra questi, particolare attenzione ha suscitato l' antigene riconosciuto dall'anticorpo monoclonale Ki-67, oggi parzialmente caratterizzato come proteina non-istonica del peso molecolare di 345-395 kD, codificata da un gene localizzato sul cromosoma 10q25-ter, ed espressa in tutte le cellule proliferanti (202). Vantaggi non indifferenti sono la possibilità di condurre la valutazione su ampie estensioni di tessuto con preciso riferimento topografico alla componente tumorale infiltrante e la sua applicabilità anche ad agoaspirato. La limitazione su materiale congelato è stata superata dalla recente disponibilità di un nuovo anticorpo, MIB-l, capace di funzionare anche su materiale fissato in formalina. Tale determinazione necessita ancora di una validazione prognostica.

Un successivo approccio utilizzato è la determinazione della percentuale di cellule in fase S, ossia in sintesi di DNA (CMF-S), mediante citometria a flusso (203). La metodica si basa sulla capacità di alcuni fluorocromi (ioduro di propidio, mitramicina, bromuro di etidio, DAPI etc) di legarsi stechiometricamente al DNA e di emettere una fluorescenza, direttamente proporzionale al contenuto nucleare di DNA. La percentuale di cellule in fase S viene calcolata utilizzando modelli matematici che consentono di determinare le frazioni di cellule anche nelle altre fasi del ciclo (G_{O1}, $G_{2/M}$). La determina-

zione citofluorimetrica permette di analizzare in breve tempo un elevato numero di cellule e può essere condotta su materiale fresco o congelato o su tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina, anche se con una minor fattibilità. La limitazione sta nel fatto che essa viene condotta su sospensioni cellulari o nucleari ottenuti da disaggregazione del tessuto tumorale e cioè su campioni contenenti tutte le componenti cellulari.

Marcatori di invasività

Il sistema degli attivatori del plasminogeno gioca un importante ruolo nell'invasione tumorale e nella metastatizzazione. Il gruppo tedesco di Janicke per primo ha riportato che i livelli tissutali tumorali dell'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasico e del suo inibitore (PAI-1) sono fattori prognostici importanti sia per le pazienti con ca. mammario operabile con metastasi ascellari linfonodali che linfonodi negativi (204). I pazienti, con alti livelli di u-PA e/o PAI-1 determinati con saggi ELISA sul cytosol di omogenati cellulari tumorali, avevano una sopravvivenza libera da malattia ed una sopravvivenza globale significativamente più breve rispetto a quelle delle pazienti con livelli tissutali tumorali più bassi. L'importanza prognostica di u-PA e PAI-1 in particolare per le pazienti con carcinoma della mammella linfonodo negativo è stato successivamente confermata da numerosi altri gruppi di ricerca.

Sulla base di queste evidenze, recentemente, i livelli di espressione tissutali tumorali di UPAe PAI-I sono stati applicati per la prima volta prospetticamente in uno studio clinico randomizzato per la selezione di pazienti linfonodo negativo da candidare o meno ad un trattamento sistemico adiuvante (204).

Marcatori di neoangiogenesi

E' da ritenersi definitivamente accertato che lo sviluppo del tumore primitivo e delle sue metastasi dipendano criticamente dalla neoangiogenesi tumore-indotta. Questo delicato processo coinvolge una cascata di eventi e fattori pro ed antiangiogenici presenti a livello extra ed intracellulare. Numerosi di questi fattori sono stati studiati come fattori prognostici per il ca. mammario umano (205).

La misura più comunemente utilizzata per la determinazione delle caratteristiche neoangiogeniche del singolo tumore è rappresentata dalla conta al microscopio ottico del numero di vasi intratumorali evidenziati o con moabs anti Fattore VIII o anti CD31 (205). Più di recente, altri fattori angiogenici sono stati valutati come il Vascular Endotelial Growth Factor, il Fibroblast Growth factor B, etc.

In generale, i dati supportano l'ipotesi che la valutazione delle caratteristiche angiogenetiche tumorali possa permettere di distinguere tra pazienti con tumori ad andamento più o meno aggressivo.

FATTORI BIO-MOLECOLARI

Oncogene CerbB$_2$/Her2/neu

L'oncogene HER-2/neu, localizzato sul 17q21 ed anche noto come c-erbB-2, codifica per una glicoproteina trasmembrana di 185-kd correlata ma distinta dal recettore per l'Epidermal Growth Factor e provvista di attività tirosino-chinasica. Alterazioni del gene e/o overespressione della proteina risulta presente in circa il 30% dei carcinomi mammari (206). Per l'analisi delle alterazioni di questo gene possono essere analizzate diverse tecniche laboratoristiche ed in particolare l'analisi immunoistochimica ed ELISA per determinare la espressione della proteina; un Southern blotting o tecnica di fluorescenza in situ (FISH) per la valutazioni delle amplificazioni del gene (207). Infine, ancora tecniche ELISAsono state più di recente proposte per la determinazione a livello circolante di un frammento extracellulare clivato del recettore (208). La FDAha di recente definitivamente approvato per la pratica clinica la tecnica ICAper l'analisi della espressione e la tecnica FISH per la quantificazione della amplificazione.

La tecnica di laboratorio più utilizzata è sicuramente quella immunoistochimica che comunque risulta delicata dal punto di vista della riproducibilità inter/intra-laboratorio. In generale, gli studi pubblicati hanno utilizzato valori cut-offs di espressione di HER-2/neu ottimizzati retrospettivamente per individuare sottogruppi di pazienti a diversa prognosi. La variabilità dei detti criteri per la classificazione della espressione di HER-2/neu e dei reagenti utilizzati rendono in definitiva non semplice una sintesi delle evidenze sul valore clinico delle alterazioni di questo oncogene sin qui disponibili.

Dopo un primo dato pubblicato da Slamon nel 1987 (209), decine di lavori hanno verificato l'eventuale valore prognostico delle alterazioni di questo gene. In una recente revisione della letteratura che ha considerato 47 studi retrospettivi per un totale di 15.000 pazienti, la overespressione di HER-2/neu è risultata associata ad una prognosi infausta sia in termini di intervallo libero di malattia che di sopravvivenza globale limitatamente alle pazienti con linfonodi ascellari positivi. Al contrario, contrastanti risultano i dati sul significato prognostico di HER-2/neu nei pazienti con linfonodi negativi (210).

Interessante, ma che sicuramente necessita di ulteriore approfondimento, infine lo studio delle relazioni esistenti tra livelli di antigene HER-2/neu nel siero di pazienti con cancro alla mammella ed espressione tissutale tumorale del recettore.

L'aspetto sicuramente più interessante dell'analisi tissutale tumorale di HER-2/neu è comunque attualmente rappresentato dalla sua valenza come fattore predittivo di risposta al trattamento chemio e/o ormonoterapico.

Per quanto riguarda la chemioterapia, il valore predittivo di HER-2/neu sembra sia chiaramente in relazione al tipo di farmaco o combinazione uti-

lizzati. Infatti, mentre non esistono dati chiari sulla relazione tra overespressione e risposta al classico CMF, molto interessante risulta la relazione con l'efficacia clinica delle antracicline. Soprattutto due grossi studi del CALGB (211) e del SWOG (212) dimostrano infatti che una chemioterapia contenente antracicline risulta particolarmente efficace nelle pazienti il cui tumore overesprime la proteina di HER-2/neu; non risulta, tuttavia, verificata la evidenza opposta e cioè che la mancanza di detta overespressione sia sinonimo di resistenza clinica alle antracicline.

Diversi studi hanno inoltre studiato la relazione tra espressione tissutale tumorale di HER-2/neu e resistenza al tamoxifene. In generale, la sovraespressione di HER-2/neu è stata messa in relazione con la resistenza clinica agli antiestrogeni (213) soprattutto nel sottogruppo di tumori provvisti di RE. Tuttavia, la presenza in letteratura di dati anche di segno opposto inducono a non suggerire attualmente un utilizzo clinico di detta informazione come fattore predittivo di efficacia clinica al tamoxifene.

Discorso a parte merita il problema della determinazione delle alterazioni di HER-2/neu come fattore predittivo di risposta a farmaci provvisti di specifico meccanismo di azione anti-HER-2/neu. Di recente, questo approccio ha avuto un decisivo impulso con lo sviluppo di un anticorpo monoclonale umanizzato (Trastuzumab) contro HER-2/neu capace di neutralizzare in vitro il ruolo cruciale che questo recettore svolge nel processo di cancerogenesi e progressione della malattia (214). La dimostrazione in un trial prospettico randomizzato che l'aggiunta di Trastuzumab alla comune chemioterapia migliora anche la sopravvivenza di donne con cancro della mammella metastatico, ha successivamente segnato una svolta anche di tipo clinico. Il vantaggio terapeutico è comunque limitato alle pazienti con tumore non negativo per HER-2/neu e rimanda quindi direttamente alla necessità di valutare con tecnica validata e riproducibile l'alterazione di questo oncogene.

Attualmente, l'utilizzo di Trastuzumab è autorizzato anche in Italia per il trattamento di donne con ca. mammario avanzato ed HER-2/neu amplificato (tecnica FISH) o media-alta overespressione della sua proteina (tecnica immunoistochimica).

Oncosoppressore p53

Il gene p53 è un oncosoppressore localizzato sul braccio corto del cromosoma 17, che codifica per una importante proteina coinvolta nel processo di regolazione della duplicazione e della apoptosi cellulare.

Alterazioni del gene p53 sono eventi molto frequenti, assieme ad altre anomalie molecolari, nel carcinoma della mammella.

Due sono le principali tecniche utilizzate per l'analisi di p53 nel carcinoma della mammella: l'analisi del DNAper evidenziare una serie di mutazioni di singole basi nel gene e tecniche di immunoistochimica per individuare

una anormale espressione citoplasmatica e/o nucleare, della proteina di p53. Normalmente la proteina p53 non viene accumulata nel citoplasma e nei nuclei delle cellule. Tuttavia, quando il gene è mutato, si verifica un accumulo della proteina e le tecniche di immunoistochimica, avvalendosi di diversi anticorpi, sono in grado di evidenziare questa espressione.

Anche per questo oncosoppressore, non sono mancati gli studi intesi a verificarne il valore come fattore prognostico-predittivo (215). Tuttavia, a differenza che per il ca. del colon, i dati in letteratura sulle anomalie di p53 e la prognosi nel carcinoma della mammella si presentano contradditori probabilmente anche per le solite difficoltà di riproducibilità delle tecniche laboratorisitiche di volta in volta utilizzate.

Parametri utilizzabili in trials clinici-Conclusioni

Recettori per Estrogeno e Progesterone

I recettori per Estrogeno e Progesterone devono essere considerati affidabili fattori predittivi di risposta alle terapie antiestrogeniche. Lo stato recettoriale ormonale deve quindi essere utilizzato per identificare pazienti sia in pre che post-menopausa che con maggiore probabilità possono beneficiare di terapie di tipo ormonale sia in fase adiuvante che di malattia ricorrente o metastatica. Di conseguenza, la determinazione di questi recettori ormonali è raccomandata in qualunque tipo di carcinoma della mammella primario ed anche in caso di lesioni metastatiche quando il quadro clinico ne richieda la verifica.

Al contrario, i recettori per estrogeno e progesterone devono essere considerati fattori prognostici relativamente deboli e quindi da non utilizzare per assegnare un paziente a un determinato sottogruppo prognostico.

HER-2/neu

La determinazione del HER-2/neu nel tessuto tumorale è da considerarsi indispensabile per selezionare le pazienti da trattare con Trastuzumab, l'anticorpo umanizzato anti-HER-2/neu. Negli Stati Uniti la FDA ha finora approvato due Tecniche per la determinazione dell'espressione tissutale del HER-2/neu (immunoistochimica e FISH). In Europa tende ad essere utilizzato in modo prevalente un metodo immunoistochimico commerciale.

Inoltre, la determinazione di HER-2/neu può essere considerata per individuare sottogruppi di pazienti che possono beneficiare particolarmente da trattamenti con antracicline.

Indicatori di cinetica cellulare

Alcuni studi prospettici randomizzati (216) suggeriscono chiaramente che la determinazione della attività proliferativa tumorale possa essere utilizzata per la individuazione di sottogruppi di pazienti con linfonodi negativi a

diversa prognosi e quindi da candidare a terapie adiuvanti diversificate. Un utilizzo clinico di questi fattori è comunque da considerare solo all'interno di studi clinici e quando provenienti da laboratori sottoposti a severi programmi di controllo di qualità. Le tecniche attualmente considerabili per una caratterizzazione cinetico-proliferativa tumorale sono rappresentate dalla Percentuale di cellule in Fase S determinata con Citofluorimetria a flusso o con la tecnica autoradiografica di incorporazione di Timidina tritiata.

uPA/PAI-1

Numerosi studi in Europa hanno concordemente dimostrato che i livelli di uPA e PAI-1 hanno un significato prognostico significativo nelle donne con linfonodi negativi. Sono stati pertanto già attivati due progetti BIOMED che coinvolgono numerosi paesi europei e prevedono la determinazione dei livelli tissutali di uPA e PAI-1 come parametro di selezione per la scelta delle pazienti da trattare. Attualmente, però non è possibile ipotizzarne un utilizzo clinico al di fuori di specifici trials clinici.

E' comunque necessario che i centri che volessero aderire a trials clinici che prevedono la determinazione di biomarcatori prognostico-predittivi seguano specifici protocolli di standardizzazione della fase preanalitica; adozione di una metodica analitica standardizzata; e di formazione permanente del personale a queste tecniche dedicato.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dr. Antonio Iacobacci per la revisione grafica complessiva dell'opera.

Bibliografia

1. Thomas CMG., Sweep CGJ.: Serum tumor markers: past, state of the art, and future. Int. J. Biol. Markers 2001; 16: 73-86.
2. Daglio C.: La storia dei marcatori tumorali: la ricerca della pietra filosofale o dell'oro delle sette città di Cibola. Il Patologo Clinico 2001; 5-6: 239-46.
3. Sell S.: Cancer Markers of the 1990s. Clinics in Laboratory Medicine 1990; 10: 1-37.
4. Bence-Jones H.: Papers on chemical pathology. Lecture III. Lancet 1847; 2: 269.
5. Ascheim S., Zondek B.: Das hormon des hypophysenvorderlappens: testobjeckt zum nachweis des hormons. Klin. Wochenschr. 1927; 6: 248-52.
6. Brown WH.: A case of pluriglandular sindrome: diabetes of bearded women. Lancet 1928; 215: 1022-3.
7. Cushing H.: The basophil adenomas of the pituitari body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). Bull. Johns Hopkins Hosp. 1932; 50: 137.
8. Gutman AB., Gutman EB.: An acid phosphatase occurring in the serum of patients with metastasizing carcinoma of the prostate gland. J. Clin. Invest. 1938; 17: 473-8.
9. Hill BR., Levi C.: Elevation of a serum component in neoplastic disease. Cancer Res. 1954; 14: 513-5.
10. Nowell PC., Hungerford DA.: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 1960; 132: 1497.
11. Parmiani G. (Ed): Gli antigeni tumorali e la risposta immune cellulomediata contro i tumori: dagli studi sperimentali alle possibili applicazioni terapeutiche nell'uomo. Torino. Edizioni Minerva Medica 1987.
12. Bombardieri E.: Biomarcatori. In: Bonadonna G. e Robustelli della Cuna G. (Eds): Manuale di Oncologia Medica 3^ ediz. Milano. Masson Italia Editori 1987.
13. Daar AS., Lennox ES.: Tumour markers and antigens. In: Daar AS. (Ed): Tumour markers in clinical practice: concepts and applications. Oxford. Blackwell Scientific Publications 1987.
14. Abelev GI.: Production of embryonal serum alpha-globulin by hepato-

mas. Review of experimental and clinical data. Cancer Res. 1963; 28: 1344-50.

15. Gold P., Freedman SO.: Demonstration of tumour-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological intolerance and absorption techniques. J. Exp. Med. 1965; 121: 439-45.
16. Bjorklund B., Bjorklund V.: Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cytoimmunological technique: presence of an insoluble, heat-labile tumor antigen. Int. Arch. Allergy 1957; 10: 153-184.
17. Bombardieri E.: 1990: Aggiornamento sui marcatori tumorali circolanti. Ligand Quarterly 1990; 9: 509-11.
18. Von Kleist S., Zimmermann W., Thompson J.: The carcinoembrionic gene family. J. Nucl. Med. Allied Sci 1990; 34(Suppl. To No.3): 30-3.
19. Uriel J., DeNechaud B., Dupiers M.: Estrogen-binding properties of rats, mouse and man feto-specific serum proteins. Demonstration by immuno-autoradiographic methods. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972; 46: 1175-80.
20. Murgita R., Tomasi T.: Suppression of the immune response by alpha-fetoprotein. J. Exp. Med. 1975; 141:269-86.
21. Bjorklund B.: Tumor markers TPA, TPA-S and cytokeratins-A working hypothesis. Tumordiagn.u.Ther. 1992; 13: 78-80.
22. Soeth E., Wirth T., List HJ. et al.: Controlled ribozyme targeting demonstrates an antiapoptotic effect of Carcinoembryonic Antigen in HT29 colon cancer cells. Clin. Cancer Res. 2001; 7: 2022-30.
23. Dittadi R., Coradini D., Meo S. et al.: Tissue Polipeptide Antigen as a putative indicator of apoptosis. Clin. Chem. 1998; 44: 2002-3.
24. Leers MP. et al.: Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. J. Pathol. 1999; 187: 567
25. Yalow RS., Berson SA.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. Clin. Invest. 1960; 30: 1157.
26. Addison GM., Hales CN.: Hormone Metab. Res. 1971; 3: 59.
27. Miles LEM., Hales CN.: Labelled antibodies and immunological assay system. Nature 1968; 219: 186-9.
28. Kohler G., Milstein C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. Nature 1975; 256: 495-7.

29. Oehr P., Liu Q.: TPS: Biology of a new tumor marker using the M3-epitope. J. Tumor Marker Oncol. 1991; 6: 99.

30. Stieber P., Hasholzner U., Bodenmuller H., et al.: Cyfra 21-1: a new marker in lung cancer. Cancer 1993; 72: 707-13.

31. Correale M., Arnberg H., Blockx P., et al.: Clinical profile of a new monoclonal antibody-based immunoassay for tissue polipeptide antigen. Int. J. Biol. Markers 1994; 9: 231-8.

32. Bahlo M., Struven D., Klapdor R.: TPAcyk Elisa zur quantitativen bestimmung des Tissue Polypeptide Antigen im serum. GIT Labor-Medizin 1993; 1-2: 24-6.

33. Bast RC.: Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian cancer. J. Clin. Invest. 1981; 68: 1331-7.

34. Hilkens J., Bujis J., Hilgers J. et al.: Monoclonal antibodies against human milk fat globule membranes detecting differentiation antigen of the mammary gland and its tumors. Int. J. Cancer 1984; 34: 197-206.

35. Kufe D., Inghirami G., Abe M. et al.: Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. Hybridoma 1984; 33: 223-32.

36. Koprowski H.: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. Somat. Cell. Genet. 1979; 5: 957-72.

37. Hilkens J.: Biochemistry and function of mucins in malignant disease. Cancer Rev. 1988; 11-12: 25-54.

38. Hilkens J., Ligtenberg M., Vos HL., Litinov SV.: Cell membrane-associated mucins and their adhesion modulating properties. Trends Biol. Sci. 1992; 17: 359-63.

39. Taylor-Papadimitriou J., Burchell J., Miles DW., Dalziel M.: MUC1 and cancer. Biochim. Biophys. Acta 1999; 1455: 301-13.

40. Bombardieri E., Seregni E., Giani D. et al.: Heterogeneity and specificity of cancer associated mucins. J. Nucl. Med. Allied Sci. 1990; 34 (Suppl. to No.3): 163-9.

41. Wang MC., Valenzuela CA., Murphy GP. et al.: Purification of a human prostatic specific antigen. Invest. Urol. 1979; 17: 159-63.

42. Brawer MK., Kirby R. (eds.) Fast facts-Prostate Specific Antigen. Oxford. Health Press 1998.

43. Saedi MS., Rittenhouse HG., Finlay JA. et al.: Le callicreine prostatiche:

l'antigene prostatico specifico e la callicreina 2 umana. J. Clin. Ligand Assay ed. It. 1999; 22: 377-81.

44. Robert M., Gibb BF., Jacobson E. et al.: Characterization of PSA proteolytic activity on its major physiological substrate, the sperm motility inhibitor precursor / semenogelin I. Biochem. 1997; 37: 3811-9.

45. Mione R., Barichello M., Sartorello P. et al.: Third-generation PSA: ultrasensitive or ultraprecise assay? Int. J. Biol. Markers 1995; 10: 229-35.

46. Benson MC., Whang IS., Olsson CA. et al.: The use of PSA density to enhance the predictive values of intermediate levels of serum prostate specific antigen. J. Urol. 1992; 147: 817-21.

47. Stenman UH., Leinonen J., Alfthan H. et al.: A complex between prostate specificantigen and alpha1-antichymotrypsin is the major form of PSA in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. Cancer Res. 1991; 51: 222-6.

48. Lilja H., Christensson A., Dahlen U. et al.: Prostate specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha1-antichymotrypsin. Clin. Chem. 1991; 37: 1618-25.

49. Oesterling JE., Jacobsen SJ., Chute CG. et al.: Serum PSA in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. JAMA 1993; 270: 860-4.

50. Huber PR., Schmid HP., Mattarelli G. et al.: Serum free prostate specific antigen: isoenzymes in benign hyperplasia and cancer of the prostate. Prostate 1995; 27: 212-9.

51. Allard WJ., Zhou Z., Yeung KK.: Novel immunoassay for the measurement of complexed prostate specific antigen in serum. Clin. Chem. 1998; 44: 1216-23.

52. Carter HB., Pearson JD., Metter EJ. et al.: Longitudinal evaluation of PSA levels in men with and without prostate disease. JAMA 1992; 267: 2215-20.

53. Schmid HP., McNeal JE., Stamey TA.: Observations on the doublig time of prostate cancer. The use of serial PSAin patients with untreated disease as a measure of increasing cancer volume. Cancer 1993; 71: 2031-40.

54. Ciatto S.: Screening for prostate cancer by PSAdetermination: a time for caution. Int. J. Biol. Markers 2000; 15: 285-7.

55. Malvano R., Giraudi G. (eds.): L'immunochimica analitica: principi, metodi, valutazione della qualità. Saluggia (VC). DiaSorin 1998.

56. Romano L., Zofra S., Giglio G.: Guida pratica agli immunodosaggi. Milano. Poli Diagnostici 1994.

57. Pazzagli M. (ed.): La Chemiluminescenza: sviluppo tecnologico ed attuali applicazioni in laboratorio. Milano. Edizioni Sorbona 1996.

58. Liotta L., Steeg P., Stetler-Stevenson W.: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell 1991; 64: 327-36.

59. Mignatti P, Rifkin DB.: Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. Physiological Reviews 1993; 73: 161-95.

60. Minna JD., Gazdar AF.: Translational research comes to age. Nature Med. 1996; 2: 974.

61. Prodi G.: Il problema dei marcatori tumorali. Quad. Ligand Quarterly 1985; 4: 13-28.

62. Fritsche HA.: I marcatori tumorali: opportunità ed aspettative. J. Clin. Ligand Assay ed. It. 1999; 22: 327-31.

63. Hildago M., Eckhardt SG.: Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. J. Natl. Cancer Inst. 2001; 93: 178-93.

64. Pegram MD., Lipton A., Hayes DF. et al.: Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. J. Clin. Oncol. 1998; 16: 2659-71.

65. Herbst RS., Lee AT., Tran HT., Abbruzzese JL.: Clinical studies of angiogenesis inhibitors: the University of Texas MD Anderson Center Trial of Human Endostatin. Curr. Oncol. Rep. 2001; 3: 131-40.

66. Huebner RJ., Todaro GJ.: Oncogenes of RNA tumour viruses as determinants of cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1969; 64: 1087.

67. Pierotti MA.: Le sonde radiomarcate. In: Buraggi GL., Bombardieri E. (eds.): Progressi della medicina nucleare in oncologia. Brescia. Clas International 1994, pp. 5-24.

68. Mullis KB. et al. : Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology 1986; 51: 263-73.

69. Knudson A.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. J. NIH Res. 1990; 2: 67-72.

70. Fearson ER., Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61: 759-67.

71. Molecule of the year- p53 sweeps through cancer research. Science 1993; 262: 1958-9.

72. Rahman N., Stratton MR.: The genetics of breast cancer susceptibility. Annu. Rev. Genet. 1998; 32: 95-121.

73. Cohen-Haguenauer O.: Gene therapy. Oncology in practice 1998; 1: 15-8.

74. Blackburn EH., Greider CW., Henderson E. et al.: Recognition and elongation of telomeres by telomerase. Genome 1989; 31: 553-60.

75. Crocker J.: Telomeres and telomerases: intimations of immortality. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 2001; 13: 889-90.

76. Buys CH.: Telomeres, telomerase, and cancer. N. Engl. J. Med. 2000; 342: 1282-3.

77. Wright WE., Shay JW., Piatyszek MA.: Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay for telomerase as a diagnostic modality in recurrent bladder cancer. Clin. Cancer Res. 1997; 3: 1593-8.

78. Robinson MO.: Telomerase and cancer. Genet. Eng. 2000; 22: 209-22.

79. Smith B., Selby P., Southgate J. et al.: Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. Lancet 1991; 338: 1227-9.

80. Corey E., Corey MJ.: Detection of disseminated prostate cells by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): technical and clinical aspects. Int. J. Cancer 1998; 77: 655-73.

81. Gelmini S., Tricarico C., Vona G. et al.: Real-time quantitative RT-PCR for the measurement of PSA mRNA in the peripheral blood of patients with prostate carcinoma using the TaqMan detection system. Clin. Chem. Lab. Med. 2001; 39: 385-91.

82. Burchill SA., Lewis IJ., Selby P.: Improved methods using the reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect tumour cells. Br. J. Cancer 1999; 79: 971-7.

83. Zhong XY., Kaul S., Lin YS. et al.: Sensitive detection of micrometastases in bone marrow from patients with breast cancer using immunomagnetic isolation of tumor cells in combination with RT-PCR for cytokeratin-19. J. Cancer Res. Clin. Oncol 2000; 126: 212-8.

84. Keilholz U.: New prognostic factors in melanoma: mRNA tumour markers. Eur. J. Cancer 1998; 34: S37-S41.

85. Millon R., Jacqmin D., Muller D. et al.: Detection of prostate-specific antigen or prostate-specific membrane antigen-positive circulating cells in prostatic cancer patients: clinical implications. Eur. Urol. 1999; 36: 278-85.

86. Kahn HJ., Yang LY., Blondal J. et al.: RT-PCR amplification of CK19 mRNA in the blood of breast cancer patients: correlation with established prognostic parameters. Breast Cancer Res. Treat. 2000; 60: 143-51.

87. Berois N., Varangot M., Aizen B. et al.:Molecular detection of cancer cells in bone marrow and peripheral blood of patients with operable breast cancer. Comparison of CK19, MUC1 and CEAusing RT-PCR. Eur. J. Cancer 2000; 36: 717-23.

88. Kienle P., Weitz J., Klaes R. et al.: Detection of isolated disseminated tumor cells in bone marrow and blood samples of patients with hepatocellular carcinoma. Arch. Surg. 2000; 135: 213-8.

89. Zippelius A., Kufer P., Honold G. et al.: Limitations of RT-PCR analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. J. Clin. Oncol. 1997; 15: 2701-8.

90. Champelovier P., Mongelard F., Seigneurin D.: CK20 gene expression: technical limits for the detection of circulating tumor cells. Anticancer Res. 1999; 19: 2073-8.

91. Zippelius A., Pantel K.: RT-PCR-based detection of occult disseminated tumor cells peripheral blood and bone marrow of patients with solid tumors. An overview. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2000; 906: 110-23.

92. Jung R., Soondrum K., Kruger W., Neumaier M.: Detection of micrometastasis through tissue-specific gene expression: its promise and problems. Recent Results Cancer Res. 2001; 158: 32-9.

93. Anker P.: Quantitative aspects of plasma/serum DNA in cancer patients. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2000; 906: 5-7.

94. Holdenrieder S., Stieber P., Bodenmuller H. et al.: Nucleosomes in serum as a marker for cell death. Clin. Chem. Lab. Med. 2001; 39: 596-605.

95. Several authors: The Human Genoma. Nature 2001; 409: 813-934.

96. Pennisi E.: Finally, the book of life and instructions for navigating it. Science 2000; 288: 2304-7.

97. Brenner S.: Genomics. The end of the beginning. Science 2000; 287: 2173-4.

98. Abbott A.: A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. Nature 1999; 402: 715-20.

99. The promise of proteomics [editorial]. Nature 1999; 402: 703.

100. Milburn J.: Beyond the genoma: turning data into knowledge. Drug Discov. Today 2001; 6: 881-3.

101. Seymour C.: Application of SPR technology in proteomics. Int. Biotech. Lab. 2001; 19: 6.

102. Schena M., Shalon D., Davis RW., Brown PO.: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 1995; 270: 467-70.

103. Chee M.,Yang R., Hubbell E. et al.: Accessing genetic information with high-density DNA arrays. Science 1996; 274: 610-4.

104. Ekins RP.: Ligand assay: from electrophoresis to miniaturized microarrays. Clin. Chem. 1998; 44: 2015-30.

105. Huang RP.: Simultaneous detection of multiple proteins with an array-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enhanced chemiluminescence (ECL). Clin. Chem. Lab. Med. 2001; 39: 209-14.

106. Perou CM., Sorlie T., Eisen MB. et al.: Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000; 406: 747-52.

107. Dhanasekaran SM., Barrette TR., Ghosh D. et al.: Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. Nature 2001; 412: 822-6.

108. Ono K., Tanaka T., Tsunoda T. et al.: Identification by cDNA microarray of genes involved in ovarian carcinogenesis. Cancer Res. 2000; 60: 5007-11.

109. Price CP.: Evidence-based laboratory medicine: supporting decision-making. Clin. Chem. 2000; 46: 1041-50.

110. Gion M., Mione R., Dittami R. et al.: Marcatori tumorali circolanti: importanza di un corretto impiego nel bilancio costo/beneficio. Argomenti di Oncologia 1989; 10: 423-30.

111. Gion M., Ramazzo A., Mione R., Bruscagnin G.: Cost/effectiveness ratio of carcinoembryonic antigen—importance of adequacy of routine requests of tumor markers. Int. J. Biol. Markers 1992; 7: 179-82.

112. Takagi Y.: Good laboratory management and clinical laboratory physician. Rinsho Byori 2000; 48: 843-5.

113. American Society of Clinical Oncology (ASCO): Clinical practice guide-

lines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. J.Clin. Oncol. 1996; 14: 2843-77.

114. American Society of Clinical Oncology (ASCO): 1997 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. J. Clin. Oncol. 1998; 16: 793-5.

115. American Society of Clinical Oncology (ASCO): 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines. J. Clin. Oncol. 2001; 19: 1865-78.

116. Gion M., Boracchi P., Biganzoli E., Daidone MG.: A guide for reviewing submitted manuscripts (and indications for the design of translational research studies on biomarkers). Int. J. Biol. Markers 1999; 14: 123-33.

117. Hayes DF., Bast RC., Desch CE. et al.: Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. J. Natl. Cancer Inst. 1996; 88: 1456-66.

118. Canadian Task Force on the Periodic Health Examination: The periodic health examination. Can. Med. Ass. J. 1979; 121: 1193-254.

119. Witliff JL., Kaplan LA. (Eds.): Guidelines for the analytical performance and clinical utility of tumor markers: Standards of laboratory practice. Rye brook NY, USA. NACB 1998; 1-46.

120. European Group on Tumour Markers: Consensus Recommendations. Anticancer Res. 1999; 19: 2785-820.

121. Caputo M., Dorizzi RM., Carmignoto F.: Linee guida per il monitoraggio biochimico delle neoplasie. Riv. Med. Lab. JLM. 2001; 2 S1: 51-9.

122. CNR P.F. ACRO: Basi scientifiche per la definizione di linee guida inambito clinico per I tumori del colonretto, della mammella, del polmone, della prostata, dell'utero e dell'ovaio. Giugno 1996.

123. Comitato Nazionale per lo Studio dei Marcatori Tumorali della SIPDTT: I marcatori tumorali nella pratica clinica. Acta Oncologica 1993; 14.

124. Gion M.: Guida all'uso clinico dei markers tumorali. Biomedia Milano. 1997.

125. Gion M., Barioli P., Ponti A. et al.: How tumor markers are used in the routine follow-up of breast and colorectal cancer. A survey of 29 Italian hospitals. Int. J. Biol. Markers 1998; 13. 124-38.

126. Ministero della Sanità P.F. 1999: Indagine conoscitiva territoriale sull'utilizzo clinico dei marcatori tumorali. Responsabile A. Paradiso-Bari.

127. Zucchelli GC., Pilo A., Chiesa MR., Mercuri A.: La qualità delle determinazioni di ormoni e marcatori tumorali: risultati dei programmi di valutazione esterna di qualità del CNR. Ligand Assay 1997; 2: 219-23.

128. Ministero della Sanità P.F. 1998: Messa a punto e valutazione di strumenti metodologici quale requisito per l'accreditamento di esami di laboratorio in oncologia. Responsabile A. Paradiso-Bari.

129. Murphy GP.: The Second Stanford Conference on International Standardization of PSAAssays. Cancer 1995; 75: 122-8.

130. Stamey TA.: Second Stanford Conference on International Standardization of PSAimmunoassays. Urology 1995; 45: 173-84.

131. Chan DW., Sokoll LJ.: WHO first international standards for PSA: the beginning of the end for assay discrepancies? Clin. Chem. 2000; 46: 1291-2.

132. Rafferty B., Rigsby P., Rose M. et al.: Reference reagents for PSA: establishment of the first international standards for free PSA and PSA (90:10). Clin. Chem. 2000; 46: 1310-7.

133. Sturgeon CM.: Tumor markers in the laboratory: closing the guideline-practice gap. Clin. Biochem. 2001; 34: 353-9.

134. Scassellati G.: Specific performance characteristics of in-vitro diagnostic medical devices. Biochim. Clin. 2000; 24: 493-8.

135. Wyatt J.: Improving the design of laboratory reports using information design principles. Abs for RCPath Informatics Day 8/2/2001.

136. Dalen A. van: Quality control and standardization of tumour marker tests. Tumor Biol. 1993; 14: 131-5.

137. Fraser CG.: The application of theoretical goals based on biological variation data in proficiency testing. Arch. Pathol. Lab. Med. 1988; 112: 404-15.

138. Zabrecky JR., Lam T., McKenzie SJ., Carney W.: The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells SK-BR-3. J. Biol. Chem. 1991; 266: 1716-20.

139. Payne RC., Allard JW., Anderson-Mauser L. et al.: Automated assay for HER-2/neu in serum. Clin. Chem. 2000; 46: 175-82.

140. Carter P., Presta L., Gorman CM. et al.: Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992; 89: 4285-9.

141. Cheung KL., Pinder SE., Paish C. et al.: The role of blood tumor marker measurement (using a biochemical index score and c-erbB2) in directing chemotherapy in metastatic breast cancer. Int. J. Biol. Markers 2000; 15: 203-9.

142. Anti-Bcbrex-test. Insert in www.altegen.com

143. Clinical Trials. Eur. Clin. Lab. 2001; 20: 22.

144. Carducci MA., DeWeese TL., Nelson JB.: Prostate-specific antigen and other markers of therapeutic response. Urol. Clin. North Am. 1999; 26: 291-302.

145. Mikolajczyk SD., Marker KM., Millar LS.: A truncated precursor form of prostate-specific antigen is a more specific serum marker of prostate cancer. Cancer Res. 2001; 61: 6958-63.

146. Tello FL., Prats CH., Gonzales MD.: Free and complexed prostate-specific antigen (PSA) in the early detection of prostate cancer. Clin. Chem. Med. Lab. 2001; 39: 116-20.

147. Zhang WM., Finne P., Leinonen J. et al.: Determination of prostate-specific antigen complexed to alpha(2)-macroglobulin in serum increases the specificity of free and total PSA for prostate cancer. Urol. 2000; 56: 267-72.

148. Huber PR., Schmid HP., Mattarelli G. et al.: Serum free prostate specific antigen: isoenzymes in benign hyperplasia and cancer of the prostate. Prostate 1995; 27: 212-9.

149. Hilz H., Noldus J., Hammerer P. et al.: Molecular heterogeneity of free PSAin sera of patients with benign and malignant prostate tumors. Eur. Urol. 1999; 36: 286-92.

150. Chen LM., Hodge GB., Guarda LA. et al.: Down-regulation of prostasin serine protease: a potential invasion suppressor in prostate cancer. Prostate 2001; 48: 93-103.

151. Larabi A., Berteau P., Gala J. et al.: Blood-borne RT-PCR assay for prostasin-specific transcripts to identify circulating prostate cells in cancer patients. Eur. Urol. 2001; 39: 65-71.

152. Yousef GM., Diamandis EP.: The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. Endocr. Rev. 2001; 22: 184-204.

153. Takayama TK., McMullen BA., Nelson PS. et al.: Characterization of hK4 (Prostase), a prostate-specific serine protease: activation of the pre-

cursor of PSA and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase. Biochemistry 2001; 40: 15341-8.

154. Diamandis EP., Yousef GM., Soosaipillai AR. et al.: Immunofluorimetric assay of human kallikrein 6 (zyme / protease M / neurosin) and preliminary clinical applications. Clin. Biochem. 2000; 33: 369-75.

155. Schedlich LJ., Bennetts B., Morris BJ.: Primary structure of a human glandular kallikrein gene. DNA1987; 6: 429-37.

156. Becker C., Piironen T., Kiviniemi J. et al.: Sensitive and specific immunodetection of human glandular kallikrein 2 in serum. Clin. Chem. 2000; 46: 198-206.

157. Rehault S., Monget P., Mazenbourg S. et al.: Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) as a potential physiological substrates for human kallikreins hK2 and hK3. Eur. J. Biochem. 2001; 268: 2960-8.

158. Finlay JA., Day JR., Evans CL. et al.: Development of a dual monoclonal antibody immunoassay for total human kallikrein 2. Clin. Chem. 2001; 47: 1218-24.

159. Darson MF., Pacelli A., Roche P. et al.: Human kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a novel prostate cancer marker. Urology 1997; 49: 857-62.

160. Haese A., Lilja H.: hK2: a promising marker for prostate cancer. Clin. Lab. Int. 2001; 25: 20-2.

161. Nam RK., Diamandis EP., Toi A. et al.: Serum human glandular kallikrein-2 protease levels predict the presence of prostate cancer among men with elevated prostate-specific antigen. J. Clin. Oncol. 2000; 18: 1036-42.

162. Becker C., Piironen T., Pettersson K. et al.: Clinical value of human glandular kallikrein 2 and free and total prostate-specific antigen in serum from a population of men with prostate-specific antigen levels 3.0 ng / mL or greater. Urology 2000; 55: 694-9.

163. Haese A., Becker C., Noldus J. et al.: Human glandular kallikrein 2: a potential serum marker for predicting the organ confined versus non-organ confined growth of prostate cancer. J. Urol. 2000; 163: 1491-7.

164. Haese A., Graefen M., Steuber T. et al.: Human glandular kallikrein 2 levels in serum for discrimination of pathologically organ-confined from locally-advanced prostate cancer in total PSA-levels below 10 ng / mL. Prostate 2001; 49: 101-9.

165. Ylikoski A., Karp M., Pettersson K. et al.: Simultaneous quantification of human glandular kallikrein 2 and prostate-specific antigen mRNAs in peripheral blood from prostate cancer patients. J. Mol. Diagn. 2001; 3: 111-22.

166. Rivelli DF.: Il cancro del colon-retto si può prevenire. Estratto Lega Italiana per la lotta contro i tumori (sezione di Bologna) 2001: 8-10.

167. World Summit Against Cancer. Carta di Parigi Unesco 2001: 1-10.

168. Srinivas PR., Kramer BS., and Srivastava S.: Trends in biomarker research for cancer detection. The Lancet Oncology 2001; 2: 698-704.

169. Linee guida concernenti la prevenzione, la diagnostica e l'assistenza in oncologia. Suppl. ordin. alla Gazzetta Ufficiale n°100 del 2 maggio 2001: 1-135.

170. Questions and Answers about the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial. Dal sito: www.cancer net.com. Review 2001.

171. Schroder FH., Alexander FE., Baugma CH. et al.: Screening and early detection of prostate cancer. The Prostate 2000; 44: 255-63.

172. Bartsch G.: Prostate Cancer: to screen or not to screen? Cancer 1997; 80/90: 1805-81.

173. Catalona WJ., Smith DS., Ratliff TL. et al.: Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. N. Engl. J. Med. 1991; 324: 1156-61.

174. Schroder FH., Roobol-Bounts M., Vis AN., et al.: Prostate-Specific Antigen. Based early detection of Prostate Cancer validation of screening without rectal examination. Urology 2001; 57: 83-90.

175. Basi scientifiche per la definizione di linee guida in ambito clinico. CNR 1996.

176. Karazanishvili G.: PSA derivatives in the screening for prostate cancer among patients with a level total PSA between 4-10 ng/ml. European Urology Today 2000: 14.

177. Carsten S., Jung K., Lein M. et al.: Molecular Forms of Prostate-specific antigen and human Kallikrein 2 as promising tools for early diagnosis of prostate cancer. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 2000; 9: 1133-47.

178. Amante P.: Uroscreening, ecco le risposte. Tempo Medico 1999: 14.

179. Llovet JM., Bruix J. Early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Bailliere's Clinical Gastroenterology 2000; 14: 991-1008.

180. Thompson SD.: Ovarian cancer screening: a primary care guide. Lippincotts Prim Care Pract 1998; 2: 244-50.

181. Teneriello MG., Park RC.: Early detection of ovarian cancer. CA Cancer J Clin. 1995; 45: 69-70.

182. Fiorica JV., Roberts WS.: Screening for ovarian cancer. Cancer Control 1996; 3: 120-9.

183. Mazurek A., Nikliuski J., Laudanski T., Pluygers E.: Clinical tumor markers in ovarian cancer. Eur. J. Cancer Prev. 1998; 7: 23-35.

184. Bast RC. Jr, Xu FJ., Yu YH., et al.: CA125: the past and the future. Int. J. Biol. Markers 1998; 13: 179-87.

185. Berek JS., Bast RC. Jr: Ovarian cancer screening. The use of serial complementary tumor markers to improve sensitivity and specificity for early detection. Cancer 1995; 76 (Suppl): 2092-6.

186. Karlan BY.: Screening for ovarian cancer: What are the optimal surrogate endopoints for clinical trials ? J. Cell. Biochem. 1995; 23 (Suppl): 227-32.

187. Kainz C.: Early detection and preoperative diagnosis of ovarian carcinoma. Wien Med Wochenschr 1996; 146: 2-7.

188. Kramer BS., Gohagan J., Prorok PC.: NHI Consensus 1994: screening. Ginecol. Oncol. 1994; 55: S 20-1.

189. Vuento MH., Stenman UH., Pirhonen JP., et al.: Significance of a single CA125 assay combined with ultrasonography in the early detection of ovarian and endometrial cancer. Gynecol. Oncol. 1997; 64:141-6.

190. Mandel JS., Church TR., Bond JH., et al.: The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 2000; 343: 1603-7.

191. Carter CL, Allen C, Henson DE: Relation of timor size, limph-node status, and survival in 24,740 cases. Cancer 1989; 63:181-187.

192. Lippman ME, Daniel FH: Adjuvant therapy for all Patients with breast cancer? J. Natl. Cancer Inst. 93, 2001.

193. McGuire WL: Breast Cancer Prognostic Factors Evaluation Guidelines. J. Natl. Cancer Inst. 1991; 83: 154-155.

194. Fisher B, Bauer M, Wickerham et al.: Relation of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer: an NSABP up date. Cancer 1983; 52: 1551.

195. Orefice S, Rubino A.: Sentinel lymphnode: surgical standard in breast cancer. Tumori 2000; 86 (5 Suppl 1): S14-6.

196. Bloom HJ, Richardson WW: Histological grading and prognosis in breast cancer. Br. J. Cancer 1957; 11: 359-377.

197. Tsangaris TN, Knox SM, Cheek HC: Tumor hormone receptor status and recurrences in premenopausal patients with nodenegative breast carcinoma. Cancer 1992; 69: 984-987.

198. Fisher B, Redmond C, Brown A et al.: Influence of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the response to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer. J. Clin. Oncol. 1983; 4: 227-241.

199. Gottardi O, Baiocchi C, Fisher ER, et al.: Correlation between histochemically assessed hormonal receptor content and clinical course in breast cancer. Oncology 1991; 48: 221-225.

200. Silvestrini R, Daidone MG, Del Bino G, et al.: Prognostic significance of proliferative activity and ploidy in node-negative breast cancer. Ann. Oncol. 1993; 4: 213-219.

201. Paradiso A, Mangia A, Barletta A, et al.: Heterogeneity of intratumour proliferative activity in primary breast cancer: biological and clinical aspects. Eur. J. Cancer 1995; 31A(6) : 911-6.

202. Brown RW, Allred DC, Clark GM et al.: Prognostic value of Ki67 compared to S-phase fraction in axillary node negative breast cancer. Clin. Cancer Res. 1996; 2: 585-592.

203. Gasparini G, Borrachi P, Verderio P Bevilacqua P.: Cell Kinetics in human breast cancer: comparison between the prognostic value of cytofluorinetitic S-phase fraction and that of the anti-bodies to Ki67 and PCNA antigens. Int. J. Cancer 1994; 57: 822-829.

204. Janicke F, Prechtl A, Thomssen C, et al.: Randomized adjuvantchemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. J. Natl. Canc. Inst. 2001; 93, No. 12.

205. Axelsson K, Ljiung B-M, Moore D, et al.: Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. J. Natl. Canc. Inst. 1995; 87: 997-1008.

206. Ross JH, Fletcher JA.: The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. Stem Cells 1998; 16: 413-426.

207. Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, et al.: Immunohistochemical study on overexpression of c-erbB2 protein in human breast cancer: its correlation with gene amplification and long-term survival of patients. Jpn. J. Cancer Res. 1990; 81: 327-332.

208. Molina R, Jo J, Filella X, et al.: C-erbB-2 oncoprotein in the sera and tissue of patients with breast cancer: utilità in prognosis. Anticancer Res. 1996; 16: 2295-2300.

209. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al.: Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987; 235: 177-182.

210. Trock BJ, Yamauchi H, Brotzman M, et al.: c-erbB2 as a prognostic factor in breast cancer: A meta-analysis. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 2000; 19: 372a (abstr).

211. Muss HB, et al.: c-erb-B2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. N. Engl. J. Med. 1994; 330: 1260-1266.

212. Paik S, Bryant J, Park C et al.: erB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymphnode-positive, hormone receptor-negative breast cancer. JNH Cancer. Inst. 1998; 90: 1361-1370.

213. Bianco AR, de laurentis M, Carlomagno C et al.: 20 year update of the Naples Gun trial of adjuvant breast cancer therapy: evidence of interaction between c-erb-B2 expression and tamoxifen efficacy. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 1998; 17: 97a.

214. Slamon D, Leyland Jones B, Shak S et al.: Addition of Herceptin to first line chemotherapy for HER2 overexpression metastatic breast cancer markedly increases anticancer activity, a randomised, multinational controlled phase III trial. Proc. ASCO 1998; 17: A377.

215. Thor AD, Berry AD et al.: Erb-B2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. J. Natl. Cancer Inst. 1998; 90: 1346-1360.

216. Paradiso A, Schittulli F, Cellamare G, et al.: Randomized clinical trial of adjuvant fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide chemotherapy for patients with fast-proliferating, node-negative breast cancer. J. Clin. Oncol. 2001; 19 (19): 3929-37.

Indice

Editoriale . . . . . pag. 3

L'evoluzione dei markers tumorali (MT) . . . . . .» 5

Aspetti applicativi e nuovi marcatori tumorali . . . . . .» 20

Ruolo di alcuni marcatori tumorali nello screening per la diagnosi precoce dei tumori . . . . . .» 28

Premessa . . . . . .« 28

Ruolo del PSA nell'anticipazione diagnostica del carcinoma della prostata . . . . . .» 32

Ruolo dell'αFP nell'anticipazione diagnostica del carcinoma del fegato . . . . . .» 34

Ruolo del CA 125 nell'anticipazione diagnostica del carcinoma dell'ovaio . . . . . .» 35

Ruolo del s.o. (sangue occulto) nelle feci nell'anticipazione diagnostica del carcinoma del colon-retto . . . . . .» 38

Fattori prognostico-predittivi nel carcinoma della mammella . . . . . .» 40

Introduzione . . . . . .» 40

Fattori clinico-patologici . . . . . .» 41

Dimensioni del tumore . . . . . .» 41

Stato linfonodale ascellare . . . . . .» 41

Grado di differenziazione cito-istologica . . . . . .» 42

Fattori biologici

Recettori per l'Estrogeno o Progesterone . . . . . .» 42

Marcatori di proliferazione cellulare . . . . . .» 43

Marcatori di invasività . . . . . .» 45

Marcatori di neoangiogenesi . . . . . .» 45

Fattori bio-molecolari

Oncogene CerbB2 / Her2 / neu . . . . . » 46

Oncosoppressore p53 . . . . . .» 47

Parametri utilizzabili in trials clinici-Conclusioni

Recettori per Estrogeno e Progesterone . . . . . .» 48

HER-2 / neu . . . . . .» 48

Indicatori di cinetica cellulare . . . . . .» 48

uPA / PAI-1 . . . . . .» 49

Ringraziamenti . . . . . .» 49

Bibliografia . . . . . .» 50

Indice . . . . . .» 66

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 del - l'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 DNAe 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 lnfociti 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. e Paponetti B.: *Ambiente e polmone.* Aprile 2002.
157. Correale M., Paradiso A., Quaranta M.: I *Markers tumorali.* Maggio 2002.

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 20, numero 157

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 338 2202502
E-mail: sergiorassu@libero.it
sergio.rassu@medicalsystems.it

Responsabile Ufficio Acquisti
Giusi Cunietti

EDITORE

Consulenti di Redazione
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione
Carmela Tiberti

Servizio Abbonamenti
Maria Grazia Papalia
Flavio Damarciasi

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

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, Giornale della Associazione per l'Automazione del Laboratorio, Guida Pratica Immulite®, Journal of Clinical Ligand Assay, Pandora, Tribuna Biologica e Medica.

Stampa
LA STAMPA S.p.A.
16138 Genova - Salita Pino Sottano 3C
Tel. 010 8360167 - Fax 010 8367321

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Maggio 2002
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