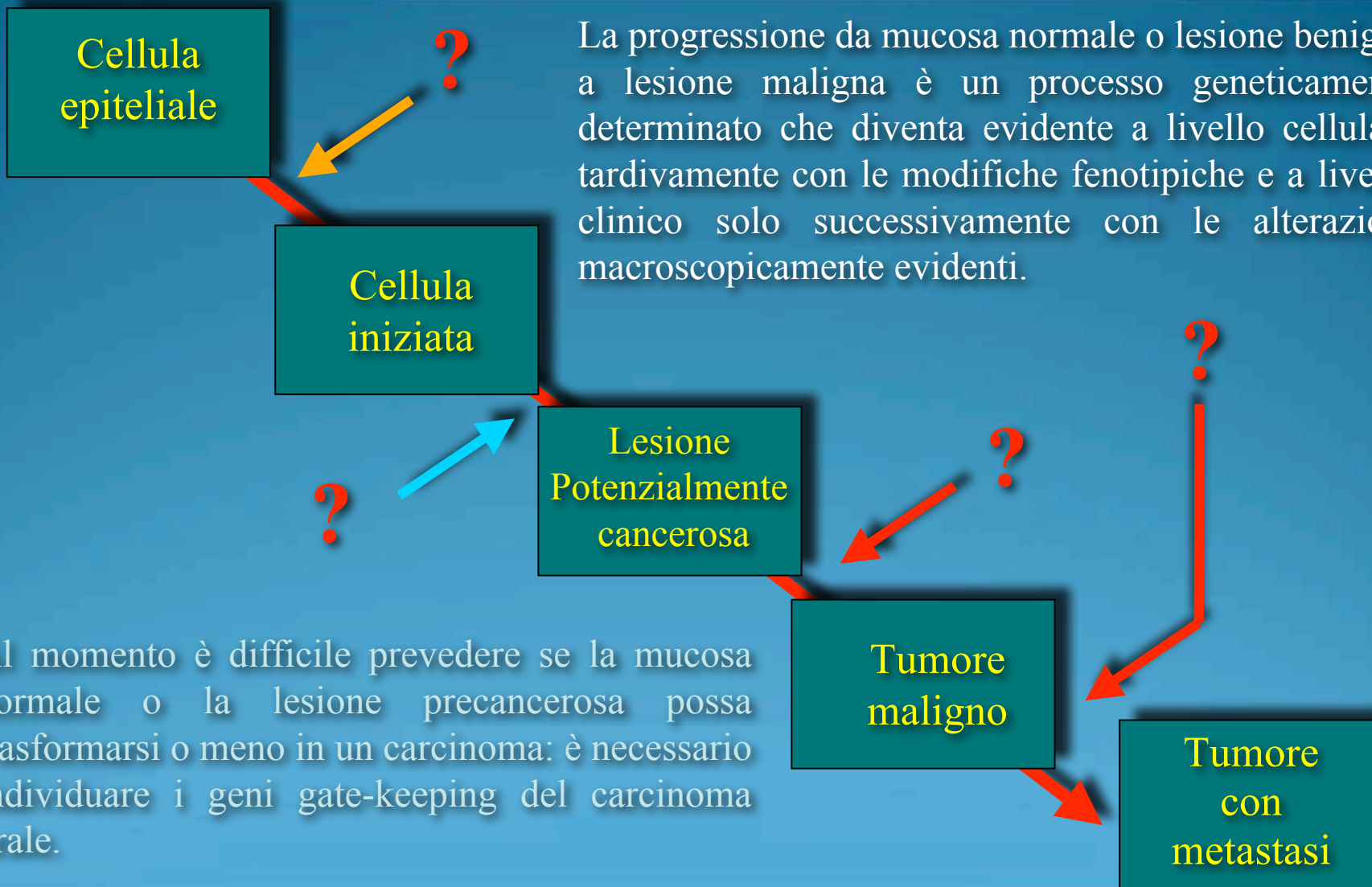




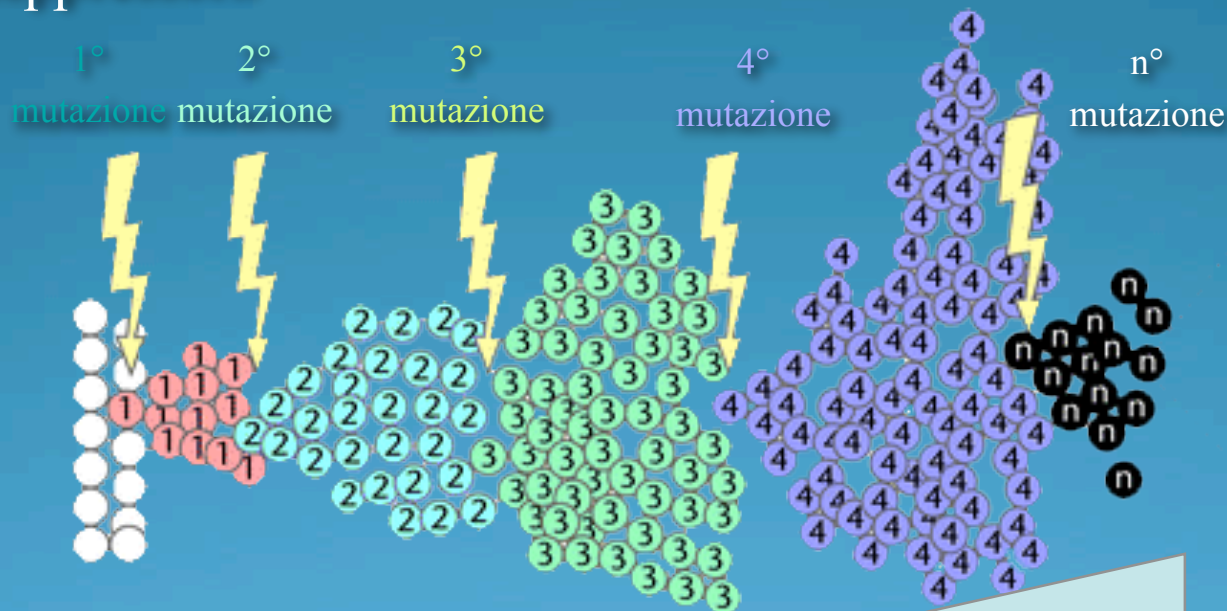
Prospettive future nella diagnosi e nella terapia del carcinoma orale



La progressione da mucosa normale o lesione benigna a lesione maligna è un processo geneticamente determinato che diventa evidente a livello cellulare tardivamente con le modifiche fenotipiche e a livello clinico solo successivamente con le alterazioni macroscopicamente evidenti.

Al momento è difficile prevedere se la mucosa normale o la lesione precancerosa possa trasformarsi o meno in un carcinoma: è necessario individuare i geni gate-keeping del carcinoma orale.

La carcinogenesi orale è un processo multifasico caratterizzato dall'attivazione inappropriata di normali geni cellulari con loro trasformazione in oncogeni e dall'inattivazione di alcuni geni oncosoppressori.



Apoptosi

- ↑ bcl-2
- ↓ P53
- ↑ survivina

CAMs

- ↓ Caderine
- +/- Integrine

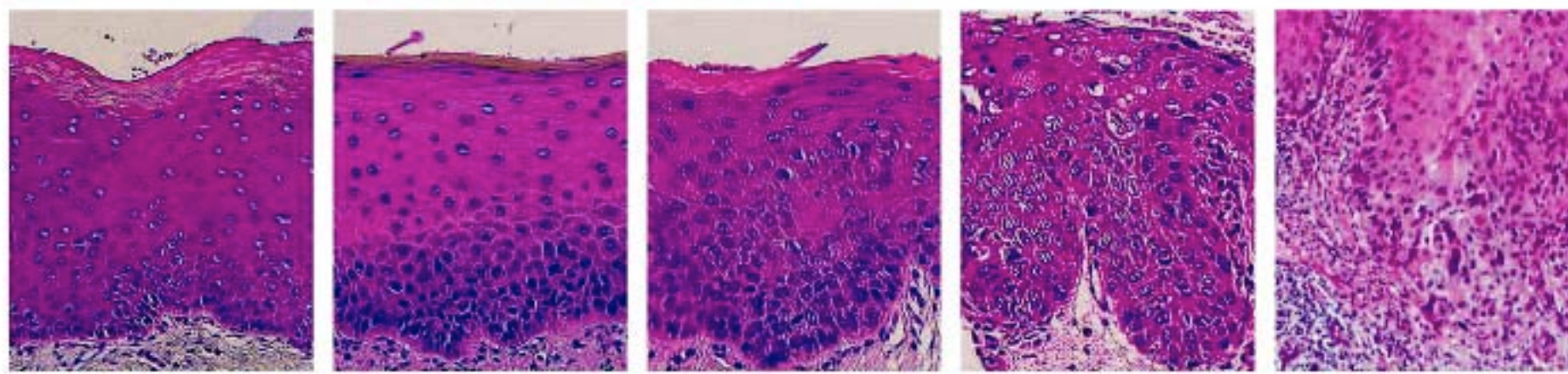
Deregolazione ciclo cellulare

- ↑ Oncogeni
- ↓ Antioncogeni

Instabilità genetica



Progressione da leucoplachia in Carcinoma



Iperplasia

Displasia
lieve

Displasia
moderata

Displasia
severa

Carcinoma

No perdita
eterozigosi

Perdita
eterozigosi
3p e 9p

Perdita addizionale di eterozigosi in
4q, 8p, 11q, 13q, 14q, 17p

Rischio
ridotto

Rischio
moderato

Rischio
elevato

3.8x

33x

Rosin MP, et al. Clin Cancer
Res. 2000 Feb;6(2):357-62.

**Table I.** Potential molecular markers for progression of oral epithelial dysplasia to carcinoma

<i>Mechanism</i>	<i>Association with dysplasia</i>
<u>Microarray technology</u> ¹²	Numerous inflammatory related genes of the arachidonic acid metabolism pathway have altered expression. The presence of invasion related genes may be useful in predicting tumor progression.
Loss of heterozygosity ^{13,14-16}	Loss of heterozygosity (LOH) at 3p and/or 9p increased the risk of progression of dysplasia to squamous cell carcinoma (SCC); LOH on additional chromosome arm (i.e., 4q, 8p, 11q, and 17p) demonstrates even higher risk. LOH at 9p21 commonly occurs in dysplasia.
Apoptosis and cell cycle alterations ¹⁷⁻²⁷	Apoptosis appears in the keratinized layer in normal epithelium and benign hyperkeratosis. p53 protein and other markers of apoptosis appear in basal and parabasal layers of dysplastic lesions that progressed to SCC. Apoptosis appears to decrease with more severe dysplasia and SCC.
Aberrant DNA expression ²⁸⁻³²	While some studies found an association with DNA ploidy and dysplasia grade, others have found no such relationship.
Matrix metalloproteinases ^{33,34}	Matrix metalloproteinases (MMP)-1 and -9 were more commonly expressed in dysplastic tissue that progressed to SCC. EMMPRIN expression was found in oral dysplasia cell lines and dysplastic lesions.
Vascular endothelial growth factor ³⁵	Concomitant expression of vascular endothelial growth factor and of MMP-11 was more common in progressing dysplastic tissue.
Cytokeratins ³⁶	Cytokeratin-4 (K4), K13, transglutaminase 3 (TG-3) was suppressed and expression of K14 and K17 was elevated in SCC and severe dysplasia. K4 and K13 were detectable in moderate dysplasia, but not SCC.
Integrins ³⁷	$\alpha_v\beta_6$ integrin was associated with malignant transformation of dysplastic oral leukoplakias, but is also expressed in non-dysplastic conditions such as lichen planus.
Cell surface glycoproteins ³⁸	Loss of expression of isoform CD44v7-8 in dysplasia may be related to poorer prognosis.
Granulocyte colony-stimulating factor receptor ³⁹	Expression elevated in dysplasia and SCC vs. normal and hyperplastic tissue.
Growth factor receptors ⁴⁰	Epidermal growth factor receptor shows a linear increase in intensity of staining, suggesting an increase in dysregulation of epithelial cell proliferation with increasing degrees of dysplasia.

Brennan M, et al. Management of oral epithelial dysplasia: a review Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol End 2007 Mar;103 Suppl 1:S19.e1-12.



FNOMCeO - CAO

Progetto di aggiornamento sul Carcinoma orale
C.A.O. – S.I.P.M.O. - S.I.O.C.M.F.

Nuove Tecnologie

All rights reserved

Prospettive future nella diagnosi e nella terapia del carcinoma orale

Prof. Lorenzo Lo Muzio et al.

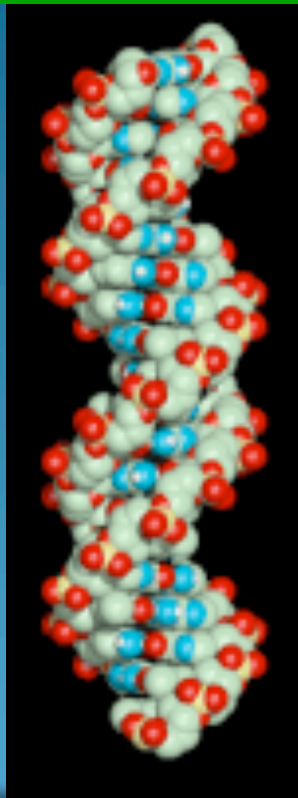
SIPMO





Genomica

Farmacogenomica



Ricerca



Clinica



Prevenzione



Diagnostica

Proteomica



FNOMCeO - CAO

Progetto di aggiornamento sul Carcinoma orale
C.A.O. – S.I.P.M.O. - S.I.O.C.M.F.

GENOMICA

All rights reserved

Prospettive future nella diagnosi e nella terapia del carcinoma orale

Prof. Lorenzo Lo Muzio et al.

SIPMO

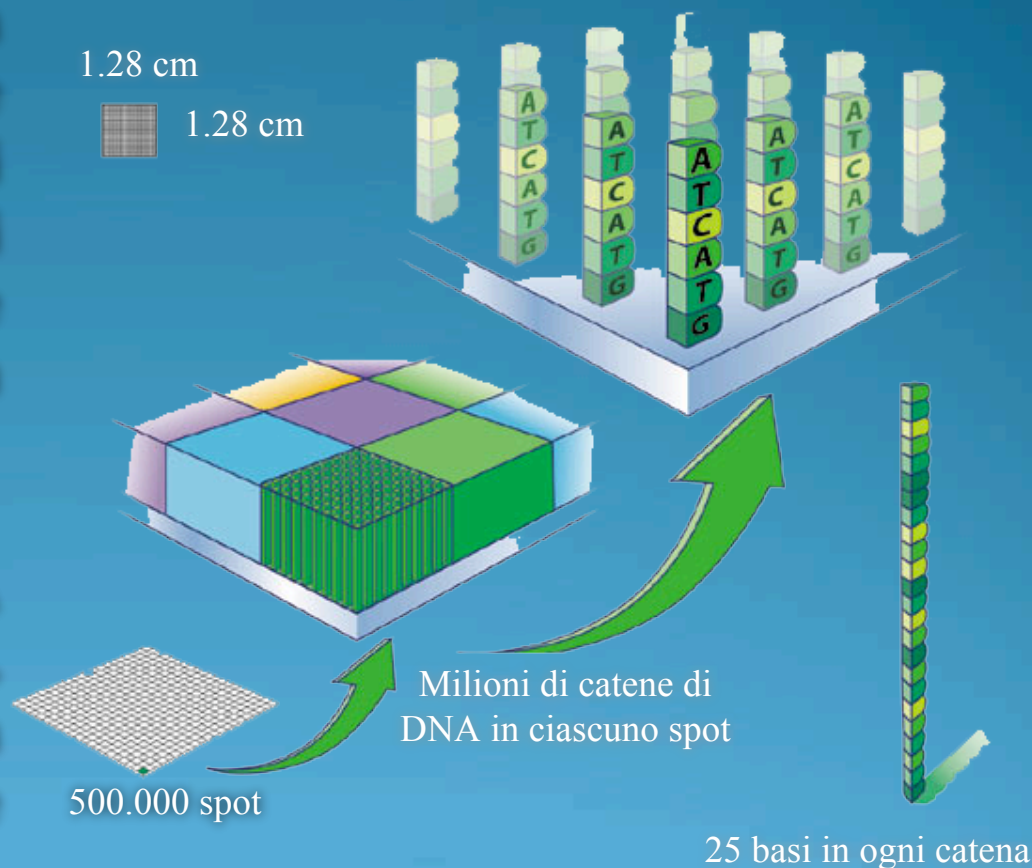




MICROARRAYS a cDNA

Un microarray è costituito da una superficie sulla quale sono depositate migliaia di sequenze specifiche di nucleotidi, ciascuna delle quali identifica un particolare gene.

Le diverse migliaia di cDNA sono poste in spot separati. Ciascuno spot rappresenta un gene, in quanto contiene numerose copie di un cDNA corrispondente a tale gene.

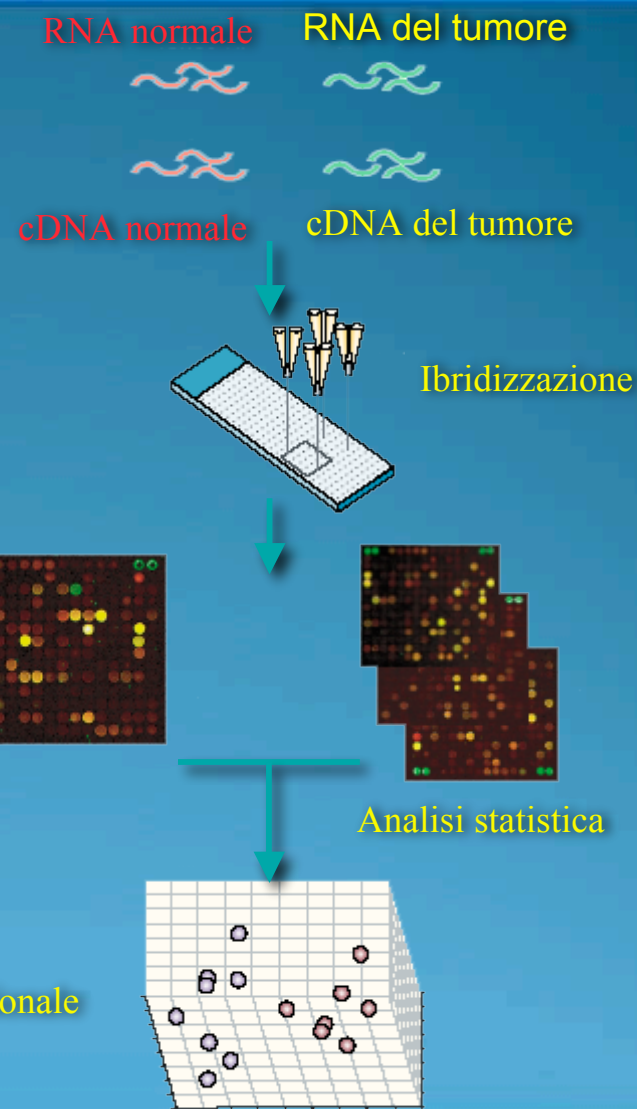


GeneChip array



MICROARRAYS a cDNA

Ibridando tale superficie con cDNA ottenuti dalla retro-trascrizione dell'RNA estratto da due campioni diversi è possibile determinare il livello di espressione dei singoli geni per confronto diretto tra l'abbondanza relativa di RNA prodotto.





Schmalbach CE, Chepeha DB, Giordano TJ et al. Molecular profiling and the identification of genes associated with metastatic oral cavity/pharynx squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2004; 130: 295-302.

Schmalbach et al. riportavano nelle loro ricerche un incremento nell'espressione di 101 geni tra carcinomi orali-orofaringei metastatici e non, con un subset di 57 geni che mostravano differenze nell'espressione genica importanti tra i tumori metastatici e la mucosa normale. Tale profilo riscontrato includeva geni coinvolti nella formazione della matrice extra-cellulare, nell'adesione, motilità, infiammazione e inibizione proteasica, la cui conoscenza può facilitare la diagnosi precoce dei tumori aggressivi e la scelta del piano di trattamento più accurato.

Belbin TJ, Singh B, Barber I et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. Cancer Res 2002; 62: 1184-90.

Belbin et al. hanno identificato 375 geni che mostrano differenze significative nell'espressione e suddiviso i pazienti con carcinoma testa-collo in due sottogruppi clinicamente distinti basati sui diversi patterns genici, suggerendo che il profilo genico può essere impiegato come fattore predittivo della prognosi.



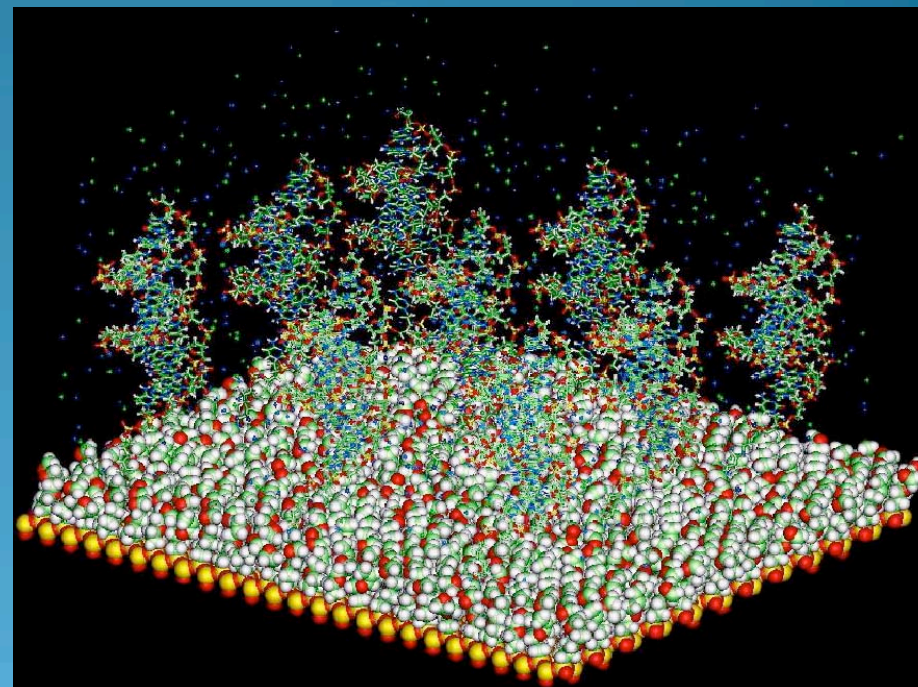
Ginos MA, Page GP, Michalowicz BS et al. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Res 2004; 64: 55-63.

Ginos et al. hanno studiato il profilo dell'espressione genica in 41 casi di carcinoma a cellule squamose della regione testa-collo, trovando un'associazione significativa tra 2890 geni e proliferazione, produzione di matrice extracellulare, espressione di citochine-chemochine, risposta immune, invasione e metastasi. I geni presi in esame mostravano differenze nella loro espressione, suggerendo una prova evidente per i nuovi biomarkers basati sull'espressione genica, del fallimento del trattamento locale in questi tumori.



Limiti del Microarray

- **Prelievo campione**
- Esame dell'espressione genica limitato alla valutazione della presenza di mRNA

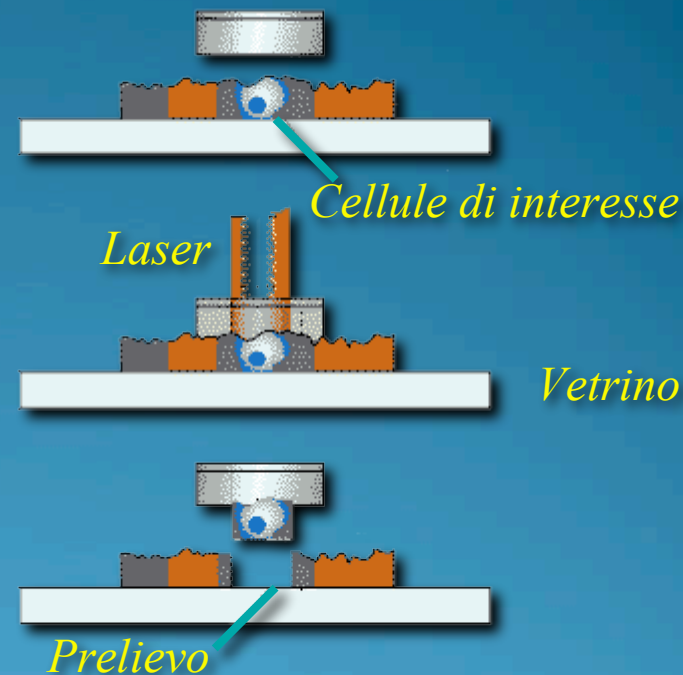




Laser capture microdissection (LCM)

Uno dei limiti principali del microarray è **la eterogeneità delle cellule** presente in un campione tissutale:

Laser capture microdissection (LCM), sviluppata al National Cancer Institute laboratories (Bethesda, Md, USA) permette di selezionare le cellule da esaminare.



Emmert-Buck MR et al. Laser capture microdissection. Science 1996;274:998-1001.

Bonner RF et al. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. Science 1997;278:1481-3.

Curran S et al. Laser capture microscopy. Mol Pathol 2000;53:64-8.

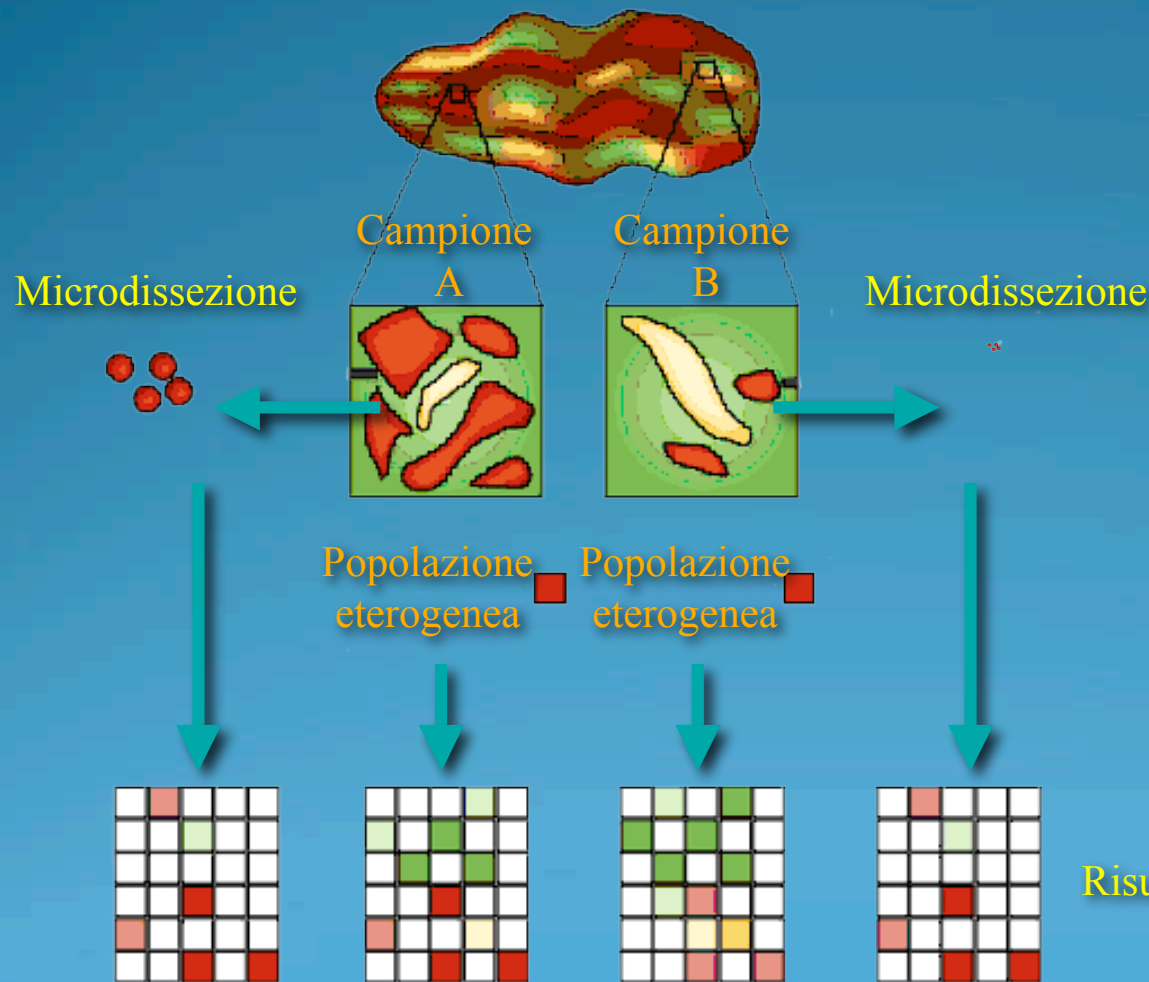
Fend F, Raffeld M. Laser capture microdissection in pathology. J Clin Pathol 2000; 53:666-72.

Mikulowska-Mennis A et al. High-quality RNA from cells isolated by laser capture microdissection. Biotechniques, 2002; 33:176-9.



Campione eterogeneo

Laser capture microdissection (LCM)





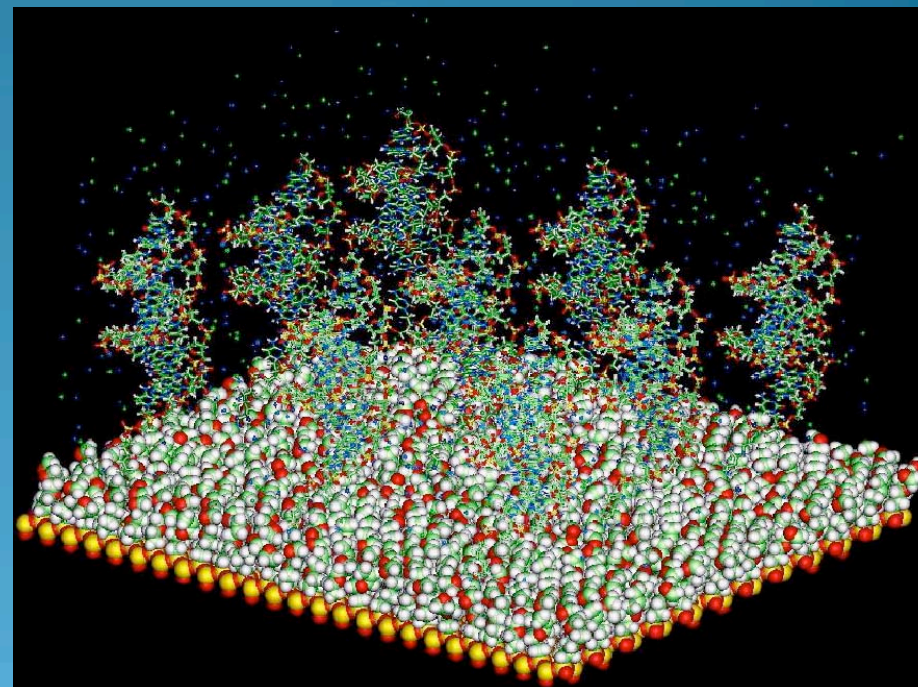
Leethanakul C, Patel V, Gillespie J et al. Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays. Oncogene 2000; 19: 3220-4.

Leethankul et al. hanno applicato con successo la microdissezione laser per ottenere nello specifico 5000 cellule dai campioni rappresentativi di carcinoma a cellule squamose della regione testa-collo e dai loro tessuti sani controlaterali per essere utilizzati negli esperimenti con il microarray. I ricercatori hanno riscontrato tra le cellule tumorali e quelle sane una notevole diminuzione nell'espressione dei marcatori di differenziazione come citocheratine, ed un aumento dei segnali di trasduzione e delle molecole che regolano il ciclo cellulare, come le proteasi, i fattori di crescita e angiogenetici.



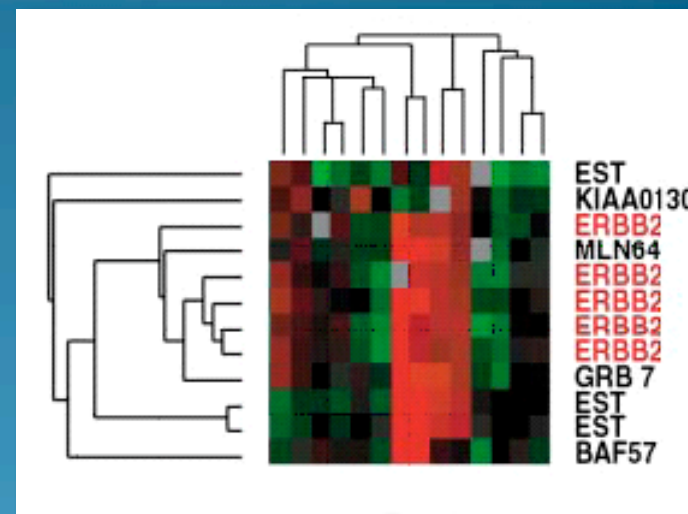
Limiti del Microarray

- Prelievo campione
- Esame dell'espressione genica limitato alla valutazione della presenza di mRNA

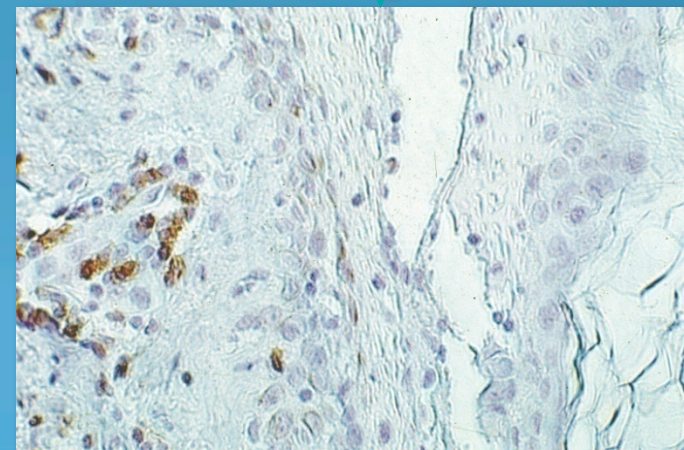




I dati ottenuti con i microarrays possono essere confermati con le metodiche tradizionali



*Alizadeh AA et al.
Towards a novel classification of human based on gene expression patterns.
J Pathol 2001; 195: 41–52.*





Garnis C, Campbell J, Zhang L et al. OCGR array: an oral cancer genomic regional array for comparative genomic hybridization analysis. Oral Oncol 2004; 40: 511-9.

In un recente studio, è stato descritto un cromosoma artificiale batterico specifico del carcinoma orale (BAC) chiamato l'array regionale genomico del CARCINOMA ORALE A CELLULE SQUAMOSE (OCGR), che è capace di rilevare alterazioni numeriche nel CARCINOMA ORALE A CELLULE SQUAMOSE. Questo è stato ottenuto mediante l'array CGH con i metodi tradizionali per l'identificazione delle alterazioni genetiche nel CARCINOMA ORALE A CELLULE SQUAMOSE, come l'analisi microsatellite e il CGH, attraverso il miglioramento della scoperta delle alterazioni numeriche alla singola scomposizione del clone BAC. Lo studio rilevava sia una diminuzione del numero di copie che un aumento nei 14 campioni clinici di CARCINOMA ORALE A CELLULE SQUAMOSE nelle nove regioni cromosomiali coinvolte nella progressione della neoplasia.



FNOMCeO - CAO

Progetto di aggiornamento sul Carcinoma orale
C.A.O. – S.I.P.M.O. - S.I.O.C.M.F.

PROTEOMICA

All rights reserved

Prospettive future nella diagnosi e nella terapia del carcinoma orale

Prof. Lorenzo Lo Muzio et al.

SIPMO





Le proteine, più che il DNA e l'RNA, sono responsabili della maggior parte delle funzioni cellulari.

L'esame diretto dei livelli di una proteina e della sua attività in una popolazione cellulare o in un tessuto è forse il miglior metodo per valutare una determinata funzione cellulare.

Lakhani S.R. and Ashworth A.

Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past?

Nature Review Cancer 2001; 1:151-7



Proteomica

Per Identificazione, caratterizzazione

- **2D-PAGE** (Poly-acrylamide Gel Electrophoresis)
- **MS** (Mass Spectrometry)
- **HPLC** (High Performance Liquid Chromatography)
- **CA** (Capillary Array)
- **MALDI** (Matrix Associated Laser Desorption/Ionisation)
 - **MALDI-TOF – MS (Time of Flight)**
 - **MALDI – ION TRAP- TOF – MS**
 - **ESI (Electron Spray Ionisation) Tandem – MS**
 - **Quadrupole**

Di tipo Funzionale

- **YEAST TWO – HYBRID SYSTEM**
- **PROTEIN MICROARRAY**
- **FRET** (Fluorescence Resonance)
- **SELDI** (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionisation)
- **TISSUE MICROARRAY**

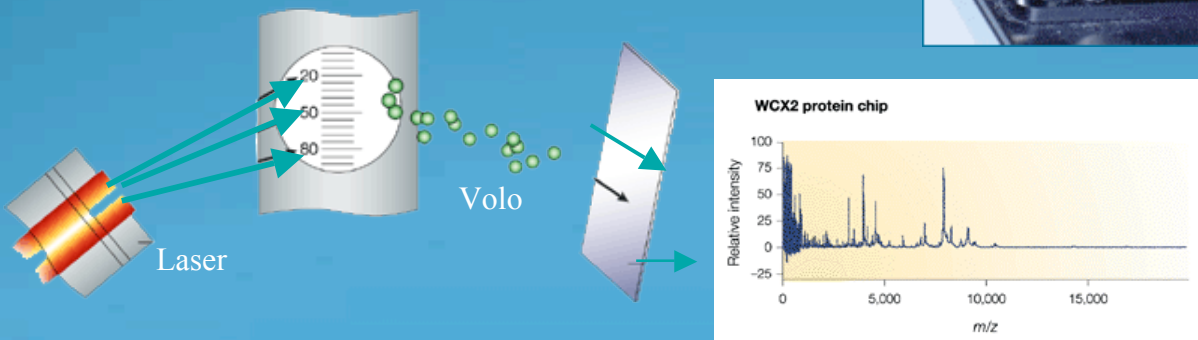
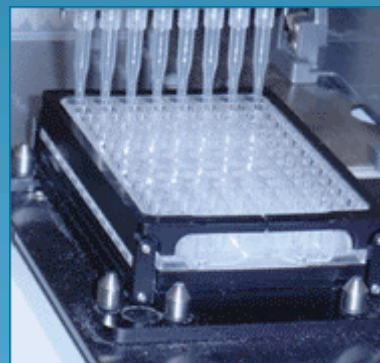


I MICROARRAYS DELLE PROTEINE (PROTEIN MICROARRAYS)



ProteinChip System,
(Ciphergen, CA, USA)

Serie 4000



All rights reserved

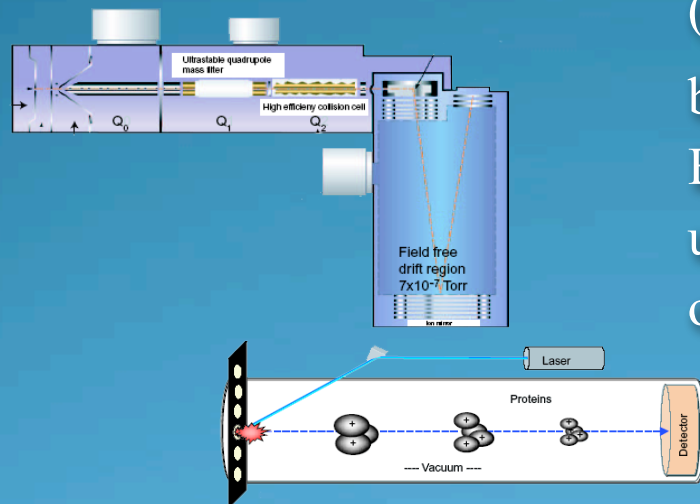
Prospettive future nella diagnosi e nella terapia del carcinoma orale
Prof. Lorenzo Lo Muzio et al.



I MICROARRAYS DELLE PROTEINE (PROTEIN MICROARRAYS)

ProteinChip Biomarker System II
(Ciphergen, CA, USA)

basato sulla tecnica SELDI (Surface
Enhanced Laser Desorption/Ionization)
usato per identificare i Biomarkers in fluidi
o tessuti o popolazioni cellulari



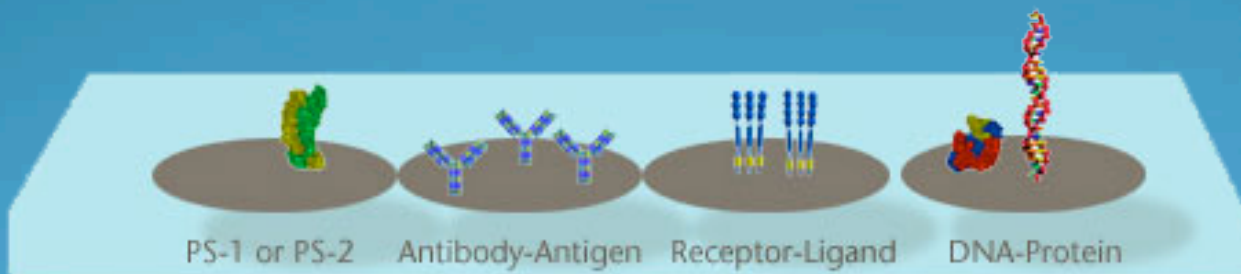
*Wiesner A.
The ProteinChip® System in Biomedical
Research. J Lab Med 2003; 27:85-91.*



I MICROARRAYS DELLE PROTEINE (PROTEIN MICROARRAYS)



SUPERFICIE CHIMICA – Profilo dell'espressione proteica



SUPERFICIE BIOLOGICA – Studio dell'interazione proteica

The ProteinChip Array



Nuovi Biomarkers individuati con il Protein Chip (tecnologia SELDI-TOF-MS)

Tumore	kDa	Nome	Autore
Pancreas	16.57	HIP/PAP-1	Rosty et al. <i>Cancer Res 2002; 62:1868-1875</i>
Vescica	3.4	Alpha-Defensina	Vlahou et al. <i>Am J. Pathol 2002; 158:1491-1501</i>
Nasofaringeo	11.6 11.8	Serum Amyloid A (SAA) isoform Serum Amyloid A (SAA) isoform	Yip et al. Poster LB-161 - AACR 2002 Yip et al. Poster LB-161 - AACR 2002
Prostata	100	PSMA	Wang et al. <i>Int J. Cancer 2002; 92:871-876</i>
Ovaio	11.7 9.2 79 54	Catena α di Aptoglobina Frammento di Aptoglobina Transferrina Catena pesante Ig	Ye et al. Poster 3687 - AACR 2002 Rai et al. <i>Arch. Pathol. Lab. Med 2002; 126:1518-1526</i> “ “ “ “ “ “



Importanza dei Biomarkers nella diagnosi dei tumori

	Tumore	Sensibilità %	Specificità %
PSA SELDI Multi-Marker Panel	Prostata	65 83	35 97
CA15.3 SELDI Multi-Marker Panel	Mammella	23 93	69 91
CA125 SELDI Multi-Marker Panel	Ovaio	35 100	98 95

Adam et al. Cancer Research 2002; 62:3609-3614

Li et al. Clinical Chemistry 2002; 48:1296-1304

Petricoin et al. The Lancet 2002; 359:572-577



He QY, Chen J, Kung HF et al. Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. Proteomics 2004; 4: 271-8.

He et al. hanno esaminato con il MALDI-TOF-MS l'espressione proteica nei carcinomi orali e nel tessuto sano ai loro margini di resezione, e hanno trovato un numero di proteine associate al tumore quali le heat shock proteins HSP60, HSP27, α B-cristallino, ATP sintetasi β , calgranulina B, miosina, tropomiosina e galectina-1 la cui espressione è significativamente alterata nelle neoplasie in rapporto al tessuto sano.

Tuttavia, per i componenti complessi ed eterogenei dei campioni tissutali, le proteine estratte sono spesso miscelate con molte altre molecole come lipidi e carboidrati, che possono essere difficilmente rimosse durante la preparazione proteica del campione, il quale risulta scarsamente separato e con bassa risoluzione degli spot proteici.



Knezevic V, Leethanakul C, Bichsel VE et al. Proteomic profiling of the cancer microenvironment by antibody arrays. Proteomics 2001; 1: 1271-8.

Per ottenere una popolazione cellulare omogenea, Knezevic et al. hanno analizzato l'espressione proteica nel tessuto di un carcinoma orale usando un microarray anticorpale e microdissezione laser, per avere le proteine totali dalle popolazioni cellulari specifiche. Sebbene le quantità cellulari ottenute con la microdissezione laser sono generalmente basse, il che rende difficile il rilevamento delle proteine, e la possibilità di artefatti causati dalle procedure di fissazione e mantenimento, gli autori hanno dimostrato che differenze quantitative e potenzialmente qualitative, nell'espressione di molteplici proteine, correlano con la progressione del tumore.



Ghafouri B, Tagesson C, Lindahl M. Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. Proteomics 2003; 3: 1003-15.

Nel tentativo di mappare le proteine presenti nella saliva attraverso la 2-D PAGE, Ghafouri et al. identificarono 100 proteine rappresentate da 20 differenti identità. Molte proteine espresse in forme differenti erano: α -amilasi, immunoglobulina A, proteina che induce la prolattina, zinco- α (2)-glicoproteina e cistatine (S, SA, D e SN), mentre altre nove erano l'antagonista del recettore interleukina-1, la proteina della ghiandola di von Ebner (lipocalina-1) e la **calgranulina** A e B (S100A8 e A9), apolipoproteina A-I, **β (2)-microglobulina**, glutatione S-transferasi P e la proteina grassa a legame acido, dimostrando che la saliva contiene un largo numero di proteine coinvolte nelle risposta infiammatoria ed immune.

Wu W, Tang X, Hu W et al. Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Clin Exp Metastasis 2002; 19: 319-26.

Wu et al. hanno impiegato la 2-D PAGE/SELDI-TOF-MS per identificare proteine differentemente espresse in due linee cellulari testa-collo (una derivava da un tumore primitivo e l'altra da un linfonodo metastatico) ottenute dallo stesso paziente. I risultati suggerivano che due proteine membrana-associate, annessina I e II, e la proteina glicolitica enolasi α possono essere molecole importanti nell'invasione e metastasi del carcinoma squamo cellulare della regione testa-collo.

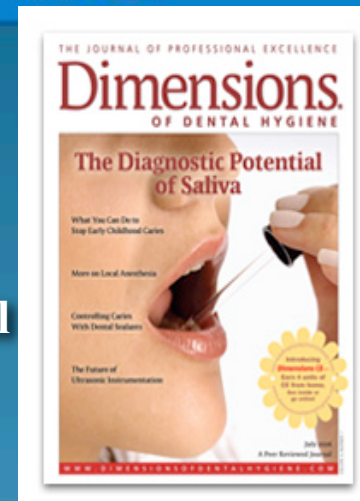
Ibrahim SO, Miron T, Krohn M et al. Tumour-associated Proteins in Oral Squamous Cell Carcinomas by Proteomics. . Cancer Genomics & Proteomics 2006; 02: 353-64.

Attraverso il MALDI-TOF-MS/2-DE, le proteine associate al tumore, quali la psoriasina, calgranulina-B e glutatione transferasi, erano alterate nelle neoplasie in rapporto ai controlli. I risultati, con i due metodi differenti, suggerivano la presenza di cambiamenti specifici nei tumori orali delle proteine in entrambe le popolazioni, ciò può indicare il coinvolgimento di molteplici meccanismi nel processo della tumorigenesi, perciò molte proteine dovrebbero essere simultaneamente colpite come bersaglio nel carcinoma orale.



Novità in campo diagnostico

Negli ultimi dieci anni è aumentato l'interesse scientifico verso il possibile utilizzo della saliva come mezzo per far diagnosi



Streckfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis.* 2002 Mar;8(2):69-76.

Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):197-212.

Choo RE, Huestis MA. Oral fluid as a diagnostic tool. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(11):1273-87

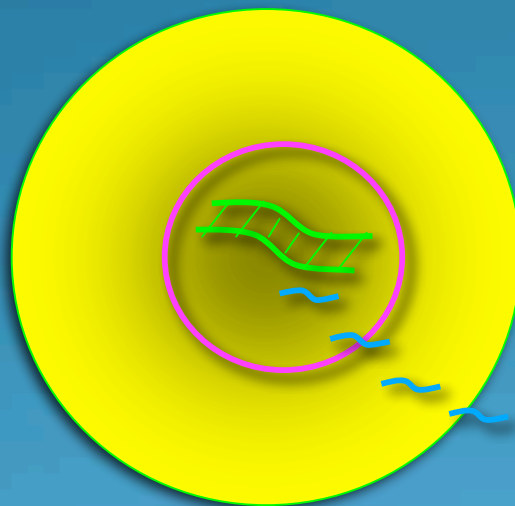
Forde MD, Koka S, Eckert SE, Carr AB, Wong DT. Systemic assessments utilizing saliva: part 1 general considerations and current assessments. *Int J Prosthodont.* 2006 Jan-Feb;19(1):43-52.

Wong DT. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *JADA.* 2006 Mar;137(3):313-21.

Wong DT. Towards a simple, saliva-based test for the detection of oral cancer 'oral fluid (saliva), which is the mirror of the body, is a perfect medium to be explored for health and disease surveillance'. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006 May;6(3):267-72.



Marker diagnostici nella saliva dei pazienti affetti da carcinoma orale



Dal nucleo al citoplasma e successivamente ai fluidi extra-cellulari/saliva

Biomarkers in saliva

- Il carcinoma orale cresce nel cavo orale
- Contatto diretto con i fluidi orali/saliva
- Rilascio dei trascritti iperespressi nei fluidi orali



El-Naggar AK et al. Genetic heterogeneity in saliva from patients with oral squamous carcinomas: implications in molecular diagnosis and screening. J Mol Diagn 2001.

El-Naggar et al. hanno realizzato su 37 pazienti un'analisi microsatellite nelle regioni cromosomiali, frequentemente alterate del carcinoma squamocellulare della testa e del collo, utilizzando la saliva come matrice biologica d'indagine. I risultati hanno evidenziato la perdita di eterogeneità di 25 markers nel 49% dei campioni in esame e la combinazione di più marcatori quali il D3S1234, D9S156, D17S799, nel 72%. Dalla ricerca si evidenzia che le cellule epiteliali presenti nella saliva di tali pazienti costituiscono materiale eccellente per l'analisi genetica.

Warnakulasuriya S et al. Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma is associated with the presence of IgG and IgA p53 autoantibodies in sera and saliva of the patients. J Pathol 2000; 192: 52-7.

L'accumulo di p53 inattiva nelle lesioni preneoplastiche (55%) e nel carcinoma orale (75%) porta alla produzione di anticorpi contro tale proteina, che possono essere individuati nella saliva permettendo una diagnosi precoce. Uno studio condotto da Warnakulasurya et al., utilizzando l'IgA-ELISA come test di laboratorio, ha rivelato la presenza di alti livelli anticorpali nel siero e nella saliva in 7 dei 26 (27%) pazienti con carcinoma orale istologicamente confermato.



Li Y, St John MA, Zhou X et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. Clin Cancer Res 2004; 10: 8442-50.

Li Y, Elashoff D, Oh M et al. Serum circulating human mRNA profiling and its utility for oral cancer detection. J Clin Oncol 2006; 24: 1754-60.

Sebbene la saliva fosse già usata per la ricerca di proteine ed RNA virale o batterico, solo recentemente è stato scoperto che nella saliva è presente anche RNA umano.

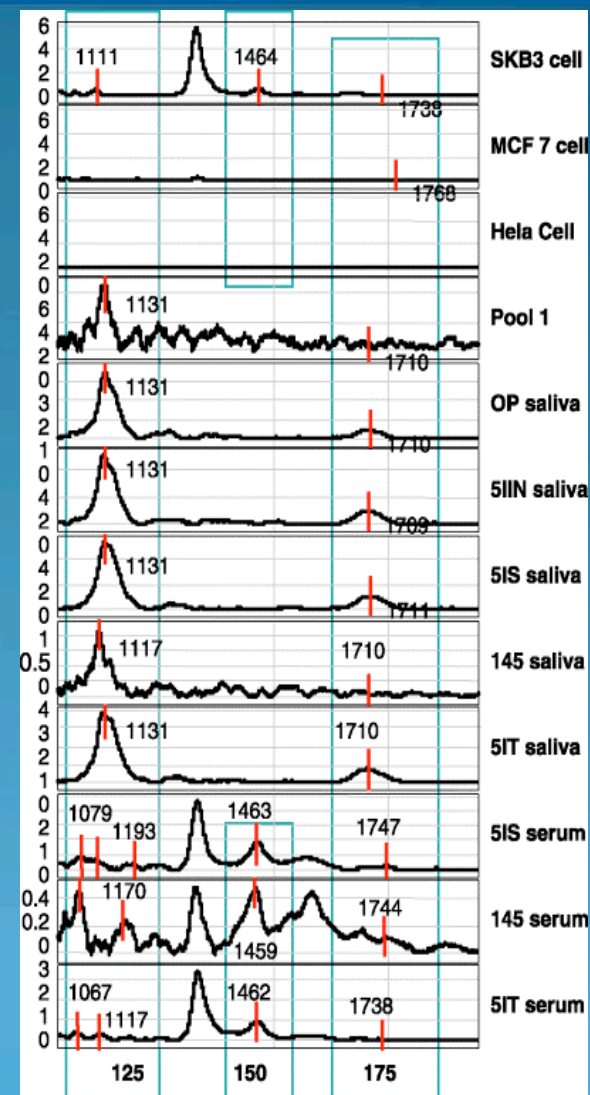
Da questa evidenza un'altro studio ha mostrato come fosse possibile predire la presenza del CARCINOMA ORALE A CELLULE SQUAMOSE con il 91% di accuratezza partendo dal rilevamento di sette RNA combinati.

Dato confermato poi su 272 pazienti affetti da CARCINOMA ORALE A CELLULE SQUAMOSE. Inoltre, confrontando questi dati con quelli relativi alla ricerca di mRNA nel siero di pazienti affetti da CARCINOMA ORALE A CELLULE SQUAMOSE, i risultati ottenibili con la saliva quale substrato sembrano essere migliori.



Streckfus CF, Bigler LR, Zwick M. The use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to detect putative breast cancer markers in saliva: a feasibility study. J Oral Pathol Med 2006; 35: 292-300.

In uno studio condotto sul carcinoma mammario, grazie alla tecnologia SELDI-TOF-MS, sono stati confrontati campioni salivari di soggetti sani e delle pazienti affette da tumore alla mammella. I protein chips impiegati hanno rilevato come alcune proteine risultavano maggiormente espresse nella saliva delle pazienti affette da tumore.





JOINT NIDCR-U01 SALIVA TECHNOLOGIES AND
PROTEOME CONFERENCE
LOS ANGELES, CA • DECEMBER 15-16, 2005



**NIDCR-University of Texas-University of Pennsylvania-Sandia National
Laboratories-University of Washington-Tufts University-UCLA**

<u>Project Number</u>	<u>Investigator</u>	<u>Title of projects founded</u>
1U01DE015017-02	Eric Anslyn	<u>Saliva Analysis with an Array Sensor</u>
1U01DE014964-02	Daniel Malamud	<u>Point Detection of Pathogens in Oral Samples via UPT</u>
1U01DE014961-02	Anup Singh	<u>Integrated Microfluidic System for Oral Diagnostics</u>
1U01DE014955-02	David Stahl	<u>DNA Microchips: Detecting Microbes in Oral Cavity Fluids</u>
1U01DE014950-02	David Walt	<u>Micro sensor Arrays for Saliva Diagnostics</u>
1U01DE015018-02	David Wong	<u>UCLA Collaborative Oral Fluid Diagnostic Research Center</u>
1U01DE014971-02	Paul Yager	<u>Rapid parallel salivary immunoassays on a disposable</u>

All rights reserved

Prospettive future nella diagnosi e nella terapia del carcinoma orale

Prof. Lorenzo Lo Muzio et al.





FNOMCeO - CAO

Progetto di aggiornamento sul Carcinoma orale
C.A.O. – S.I.P.M.O. - S.I.O.C.M.F.

UCLA Collaborative Oral Fluid Diagnostic Research Center (UCLA-COFDRC)

Grazie ad un finanziamento di 15 milioni di dollari da parte del National Health Institute Americano, è stato istituito l'UCLA-Collaborative Oral Fluid Diagnostic Research Center (UCLA-COFDRC) che ha messo a punto l' Oral Fluid MEMS/NEMS Chip (OFMNC), un sistema all'avanguardia micro- e nano-elettrico (MEMS and NEMS) per il rilevamento diagnostico salivare ultrasensibile e ultraspecifico per applicazioni con strumenti portatili, in tempo reale e a basso costo. Gli acidi nucleici possono essere individuati senza l'utilizzo di un cycler termico e le proteine senza necessità della classica metodica ELISA.



The “Human Salivary Proteome” UO1
Prof. David Wong, Program Director



All rights reserved

Prospettive future nella diagnosi e nella terapia del carcinoma orale

Prof. Lorenzo Lo Muzio et al.

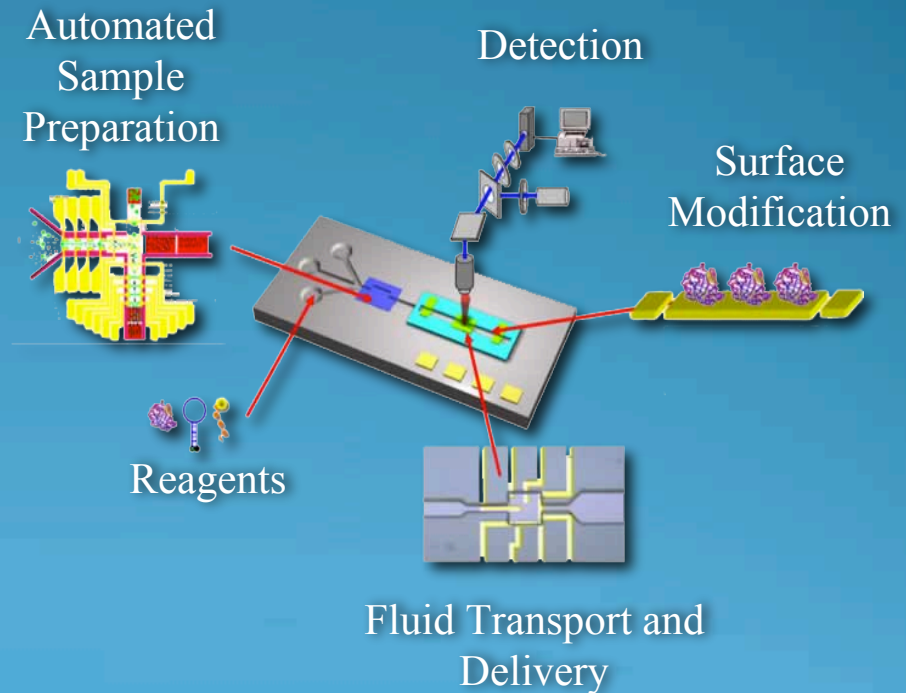
SIPMO



1) Questo chip è stato sviluppato fino a poter individuare DNA o RNA a concentrazioni femtomolari senza amplificazione PCR, utilizzando campioni con volumi di 2,5 micromolari. L'identificazione di biomarkers associati al carcinoma, come l'RNA messaggero dell'interleuchina 8, avviene in 30 minuti circa con campioni di saliva intera.

2) Le proteine inoltre possono venir rilevate con una sensibilità di 1 picogrammo/millilitro. Il test è sicuro e riproducibile e necessita di una quantità di soli 20 microlitri di saliva intera. L'utilizzo di saliva intera, sia per gli acidi nucleici che per le proteine, senza bisogno di processi intermedi, risulta essere un inconfutabile vantaggio.

UCLA-COFDRC





UCLA-COFDRC

Nel 2005, grazie a questa tecnologia ed all'alleanza con GeneFluidics Inc., un'azienda leader in bionanotecnologia e microfluidi, l' UCLA-COFDRC ha messo a punto l' **Oral Fluidic NanoSensor Test (OFNASET)**, un dispositivo portatile, automatico, facile da utilizzare che permette un rilevamento rapido e simultaneo di proteine salivari ed acidi nucleici multipli. Tuttora in continuo sviluppo e prova, questo dispositivo appare essere la promessa più interessante, dal punto di vista diagnostico, per il carcinoma orale, sia dal punto di vista applicativo che temporale.





FNOMCeO - CAO

Progetto di aggiornamento sul Carcinoma orale
C.A.O. – S.I.P.M.O. - S.I.O.C.M.F.

TERAPIA ANTITUMORALE

All rights reserved

Prospettive future nella diagnosi e nella terapia del carcinoma orale

Prof. Lorenzo Lo Muzio et al.

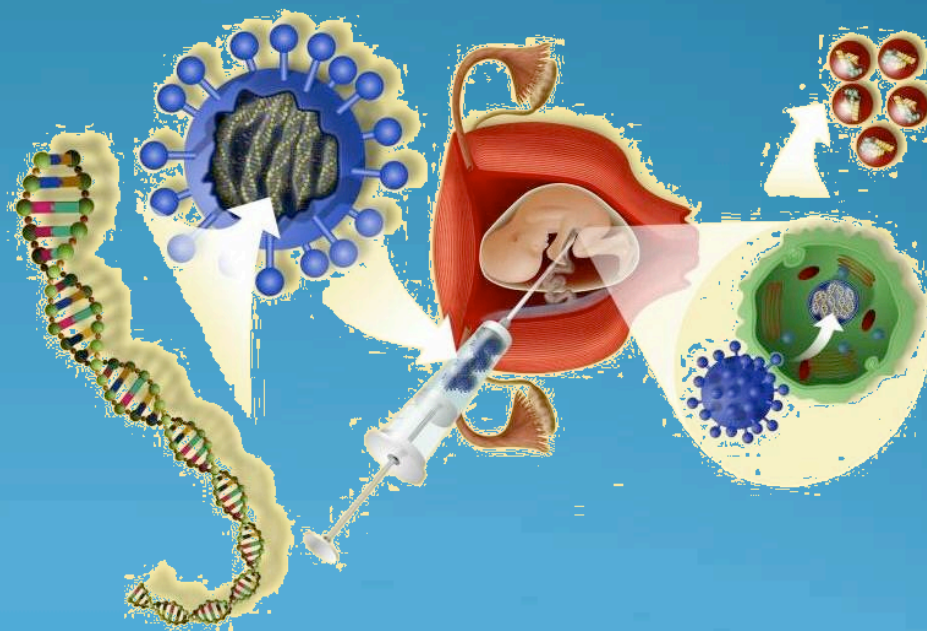
SIPMO





La terapia antitumorale può essere perseguita con:

- ❑ trattamenti tradizionali (chemioterapia, radioterapia, chirurgia)
- ❑ **terapia genica**
- ❑ terapia immunologica.





Razionale della terapia genica

La **CHEMIOTERAPIA** è il trattamento del cancro o della lesione potenzialmente cancerosa con farmaci che possono distruggere le cellule alterate.

Il farmaco ideale dovrebbe essere in grado di **uccidere solo le cellule alterate risparmiando le cellule normali.**

Problema:

Non vi sono attualmente chiare differenze tra cellule normali e cellule alterate



PRIMO PROBLEMA: Effetti collaterali

Soltanto la percentuale di divisioni cellulari rende la cellula tumorale sensibile all'azione del chemioterapico

(Citoriduzione)

Anche le cellule normali in attiva replicazione sono suscettibili all'azione del chemioterapico

Effetti collaterali a carico di Midollo, Colon, Capelli, etc..



SECONDO PROBLEMA: Resistenza del tumore

Dopo diversi cicli di chemioterapici con risoluzione e/o remissione le cellule tumorali diventano resistenti



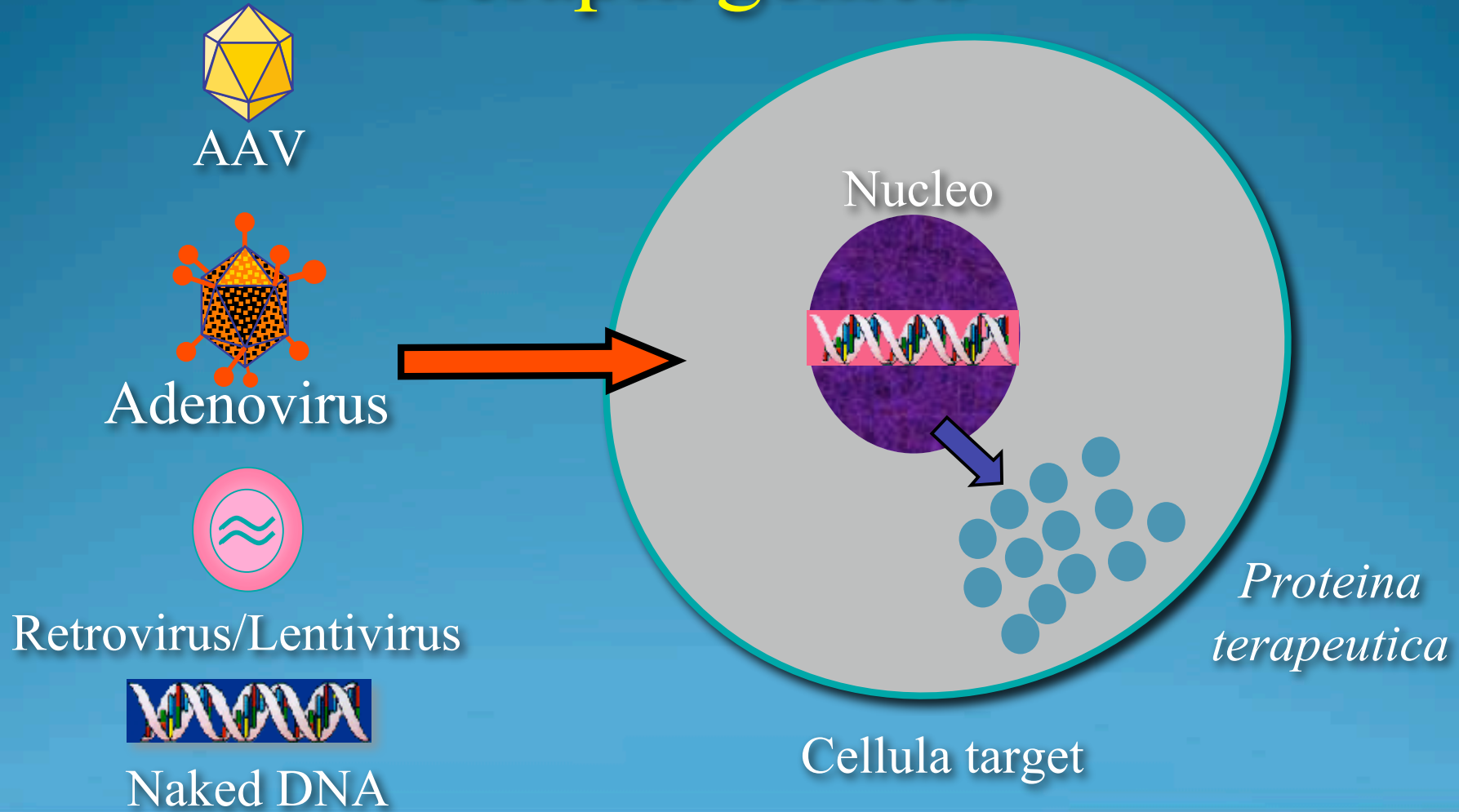
Gli effetti collaterali prevalgono sui benefici



Stop treatment ed il tumore riprende a crescere



Terapia genica



All rights reserved



La terapia genica può essere perseguita con:

- sostituzione genica
- silenziamento genico
- target per terapia specifica



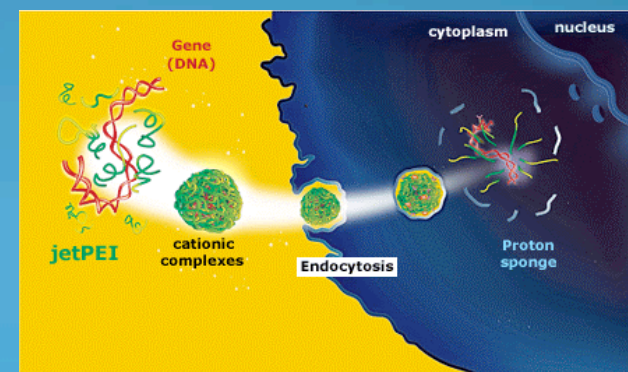
La terapia genica può essere perseguita con:

- sostituzione genica
- silenziamento genico
- target per terapia specifica



La terapia genica con sostituzione genica prevede la sostituzione di:

- ❑ un gene iperattivo/attivo con uno inattivo
(oncogene)
- ❑ un gene non funzionante con uno funzionante
(per esempio gene soppressore tumorale o gene regolatore dell'apoptosi)





- un gene iperattivo/attivo con uno inattivo
(oncogene)
 - un gene non funzionante con uno funzionante
(per esempio gene soppressore tumorale o gene regolatore dell'apoptosi)

E' questo, ad esempio, il caso della produzione di una forma difettosa di survivina (con 1 aa modificato Thr34 → Ala) con azione di blocco dell'attività della proteina ed induzione dell'apoptosi:

inibita la trascrizione del gene di survivina in linee cellulari e in topi in cui era stato indotto un Melanoma.

Grossman D. et al.

Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. PNAS 2001; 98:635-640



- un gene iperattivo/attivo con uno inattivo
(oncogene)
 - un gene non funzionante con uno funzionante
(per esempio gene soppressore tumorale o gene regolatore dell'apoptosi)

p53

- Mutazioni del gene della p53 occorrono nel 45-70% dei HNSCC
- Ad-p53: adenovirus contenente il gene wild-type della p53
- Studi preliminari di AD-p53 in pazienti con HNSCC avanzato mostrano risultati promettenti



Gendicine

Primo prodotto di terapia genica disponibile in commercio:

Adenovirus modificato rilasciante p53 contro carcinomi squamocellulare di testa e collo, licenziato in Cina dall'Industria cinese Shenzen SiBiono (2003)

Advexin

Prodotto simile che sta per essere registrato negli USA (ora in fase III della sperimentazione clinica per carcinomi squamocellulari di testa e collo, tumori del polmone e della mammella):

Si ritiene che l'Advexin sarà il primo farmaco di terapia genica registrato in USA, probabilmente nel 2009.



La terapia genica può essere perseguita con:

- sostituzione genica
- silenziamento genico
- target per terapia specifica

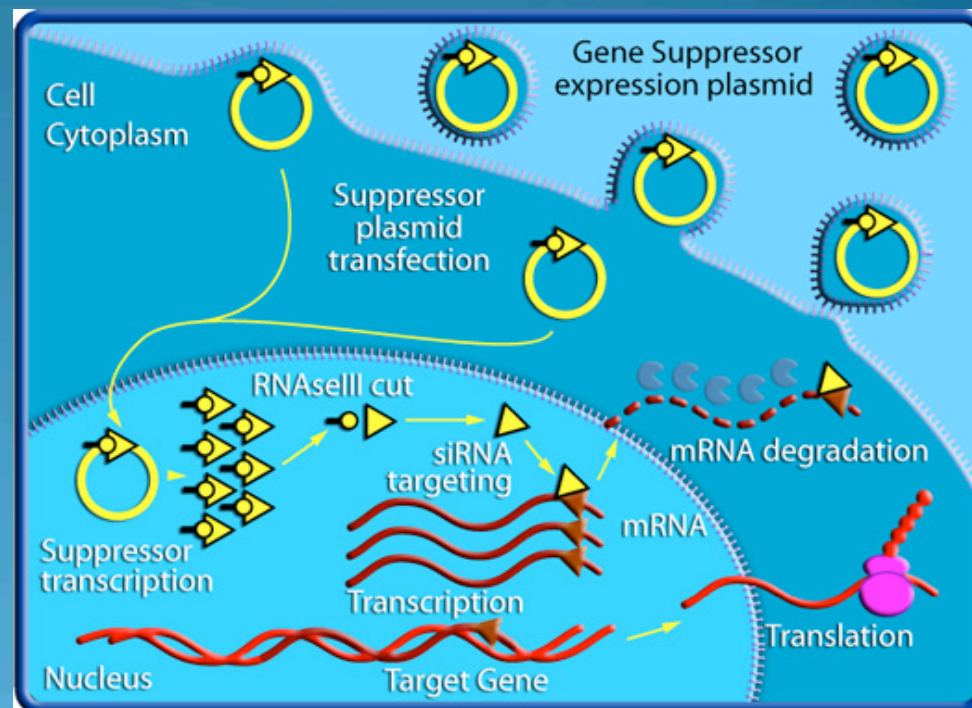


Silenziamento di un gene

Nei tumori, nella malattia di Huntington o in altre patologie ereditarie può essere utile sopprimere la funzione di un determinato gene o sostituendolo con uno inattivo o inattivando la copia mutata con la tecnica del *RNA interference* capace di riconoscere anche la differenza di un singolo nucleotide (single nucleotide polymorphism o SNP):

è perciò possibile usare la tecnica del RNA interference per colpire i SNPs singoli associati con un gene specifico per la sua manipolazione

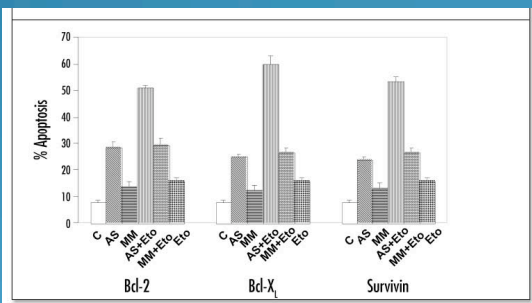
Terapia genica



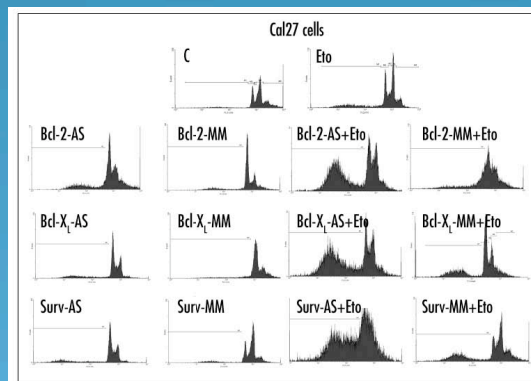
Sharma H, Sen S, Lo Muzio L, Mariggio A, Singh N. Antisense-mediated downregulation of anti-apoptotic proteins induces apoptosis and sensitizes head and neck squamous cell carcinoma cells to chemotherapy. Cancer Biol Ther. 2005 Jul;4(7):720-7.

Il trattamento di linee cellulari da carcinoma laringeo HeP2 e da carcinoma della lingua Cal27 con 400 nM antisense oligonucleotides contro Bcl-2, Bcl-X(L) e Survivin per 48h faceva decrescere la loro espressione sia a livello di mRNA che a livello proteico.

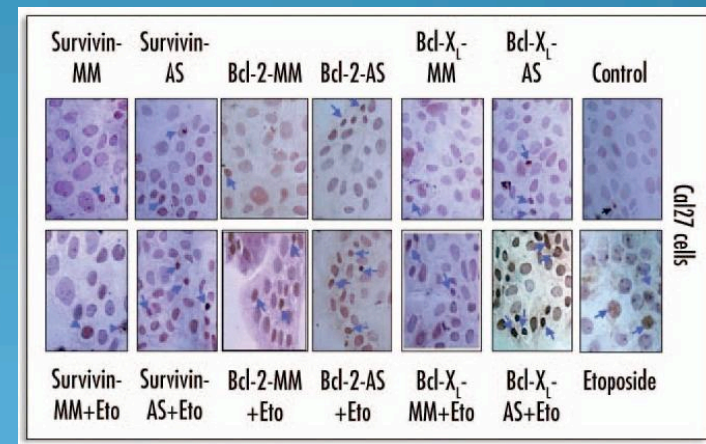
Inoltre il trattamento aumentava l'apoptosi indotta da Cisplatino ed Etoposide.



Bar diagram representing the percentage apoptosis in Cal27 cells upon various treatments.



Analysis of apoptosis by flow cytometry in Cal27 cells upon various treatments.



TUNEL assay

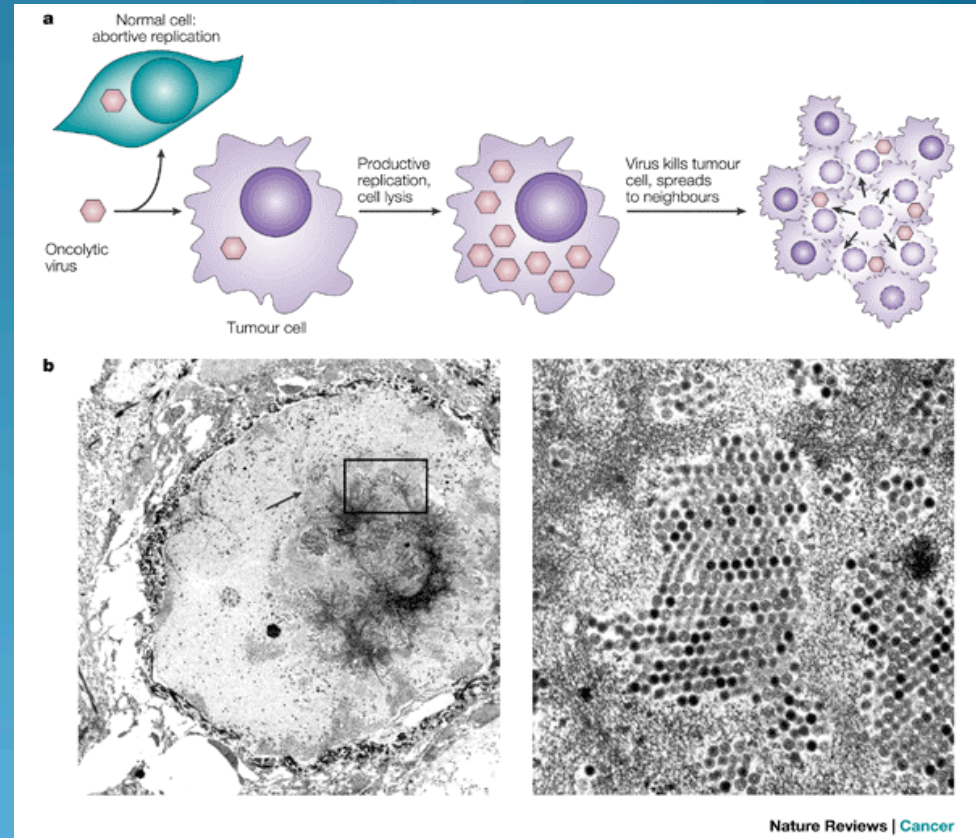


La terapia genica può essere perseguita con:

- sostituzione genica
- silenziamento genico
- target per terapia specifica

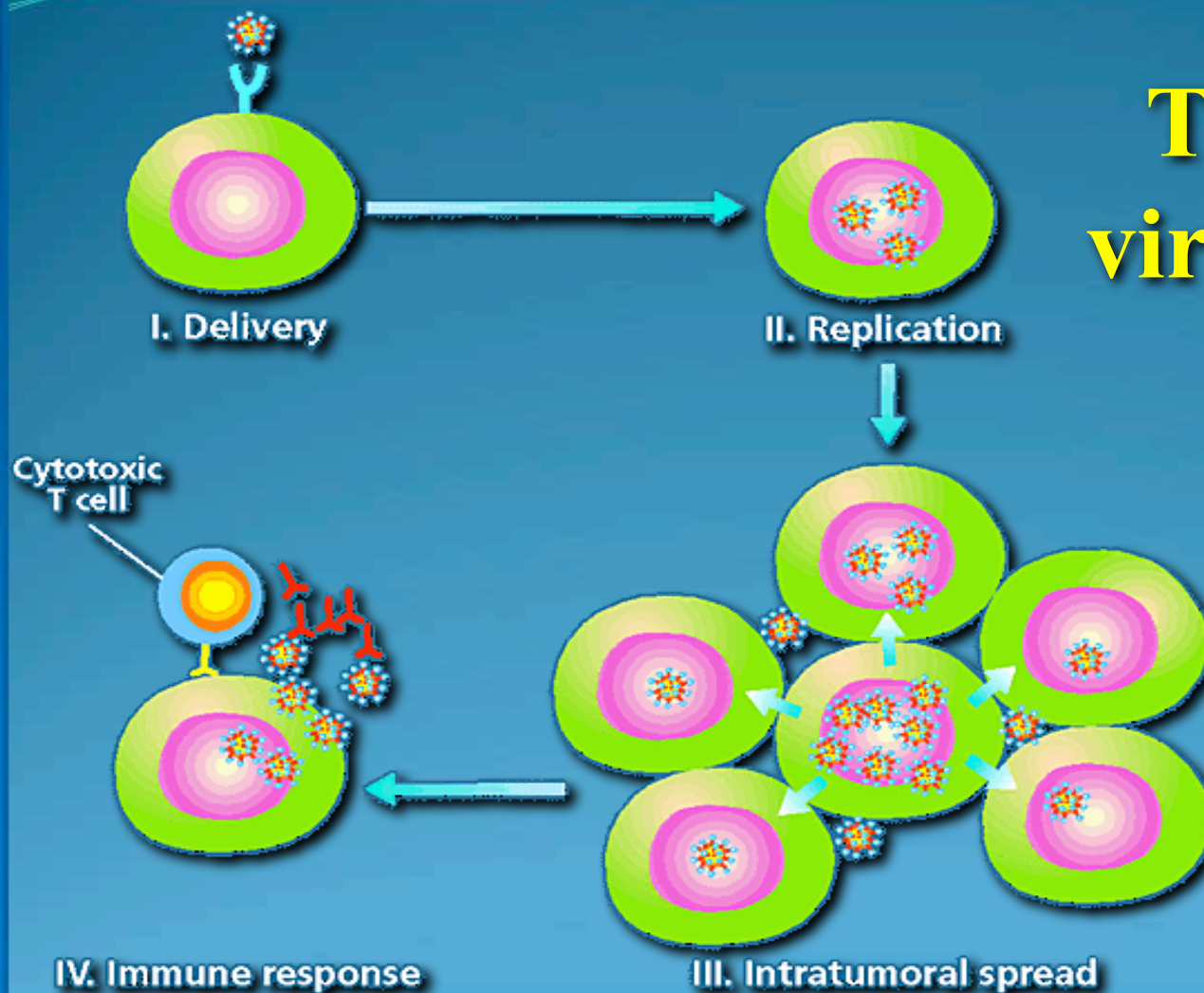
Virus oncolitici

- Virus che si replicano selettivamente nelle cellule tumorali (le cellule tumorali inattivano la pathway dell'interferon o mutano dei tumour suppressor genes, permettendo la replicazione virale)
- La loro replicazione provoca la lisi della cellula
- Sono per lo più adenovirus e herpes simplex virus, mutati per replicarsi più velocemente nelle cellule tumorali





Terapia con virus oncolitici



I virus oncolitici sono virus umani che infettano e si replicano solo nelle cellule tumorali. Distruggono le cellule tumorali ma lasciano le cellule normali per lo più non infettate



Vantaggi della terapia con virus oncolitici

1. Alto Indice Terapeutico:

100,000 cellule tumorali morte per 1 cellula normale morta.

Chemioterapia: 6 to 1. → **Minori effetti collaterali.**

2. Maggiore efficacia antitumorale dovuta alla replicazione virale:

Il Virus prolifera e rimane nell'organismo fino alla morte di tutte le cellule tumorali. **No ritrattamento estensivo.**

3. Attività sinergica Antitumorale con le terapie tumorali convenzionali



Clinical Trial Phases of Oncolytic Viruses

Virus	Administration	Cancer type	Clinical phase			
			Ps	I	II	III
Ad ONYX-015	Intratumoral + Chemotherapy	Head and neck	→			
Ad-CV787	Intratumoral + Chemotherapy	Pancreatic cancer	→			
Replicates only in PSA+ cells		Prostate cancer	→			
HSV-G207	Intratumoral	Glioblastoma	→			
No ribonucleotide reductase, so able to replicate only in dividing cells		Advanced tumors	→			
Reovirus	Intratumoral					
VSV	Intratumoral	Colon cancer	→			
	Intravenous		→			

All rights reserved

Prospettive future nella diagnosi e nella terapia del carcinoma orale

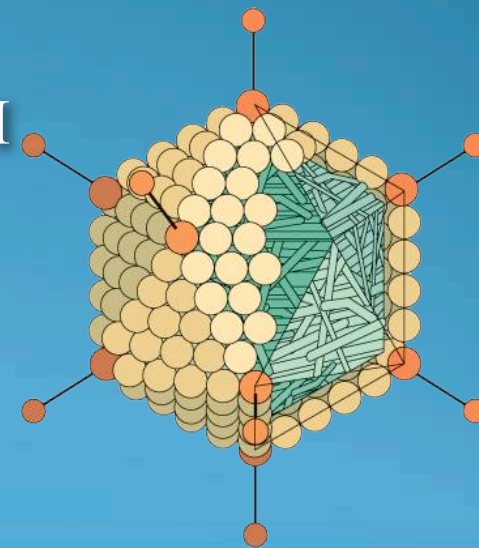
Prof. Lorenzo Lo Muzio et al.





ONYX-015

- è un adenovirus senza E1b-55k (non può replicarsi in cellule con una pathway p53 normale)
- si replica nelle cellule tumorali e ne provoca la lisi
- è impiegato per il trattamento dei tumori p53-
- è attualmente il più utilizzato Virus oncolitico
- attualmente sono in corso Trials clinici di fase III





Il primo trial clinico con questo virus fu effettuato su un campione di 22 pazienti affetti da recidiva di carcinoma squamocellulare della regione testa-collo. Nella fase I del trial nessuno dei pazienti mostrò segni di seria tossicità con l'iniezione intratumorale del virus, ma anzi con evidenza di un'attività antitumorale

Ganly I, Kirn D, Eckhardt G, et al: A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. Clin Cancer Res 6:798-806, 2000

Nella fase II del trial fu evidenziata una maggiore efficacia con iniezioni multiple nell'arco della giornata. Inoltre, quando combinata con la chemioterapia l'efficacia risultava ulteriormente aumentata

Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, et al: Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: A phase II trial. Cancer Res 60:6359-6366, 2000

Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, et al: Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. J Clin Oncol 19:289-298, 2001



L'iniezione intratumorale di ONYX-015 associato a cisplatino e fluorouracile mostrò una percentuale di risposta del 63%, con una progressione della sopravvivenza libera da malattia migliore rispetto alla sola chemioterapia. Questo risultato ha suggerito la possibilità di un utilizzo additivo e sinergico di questi agenti antitumorali.

Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al: a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. Nat Med 6:879-885, 2000



Rudin CM, Cohen EEW, Papadimitrakopoulou VA, Silverman S Jr, Recant W, El-Naggar AK, Stenson K, Lippman SM, Hong WK, Vokes EE. An Attenuated Adenovirus, ONYX-015, As Mouthwash Therapy for Premalignant Oral Dysplasia. J Clin Oncol 21:4546-4552, 2003

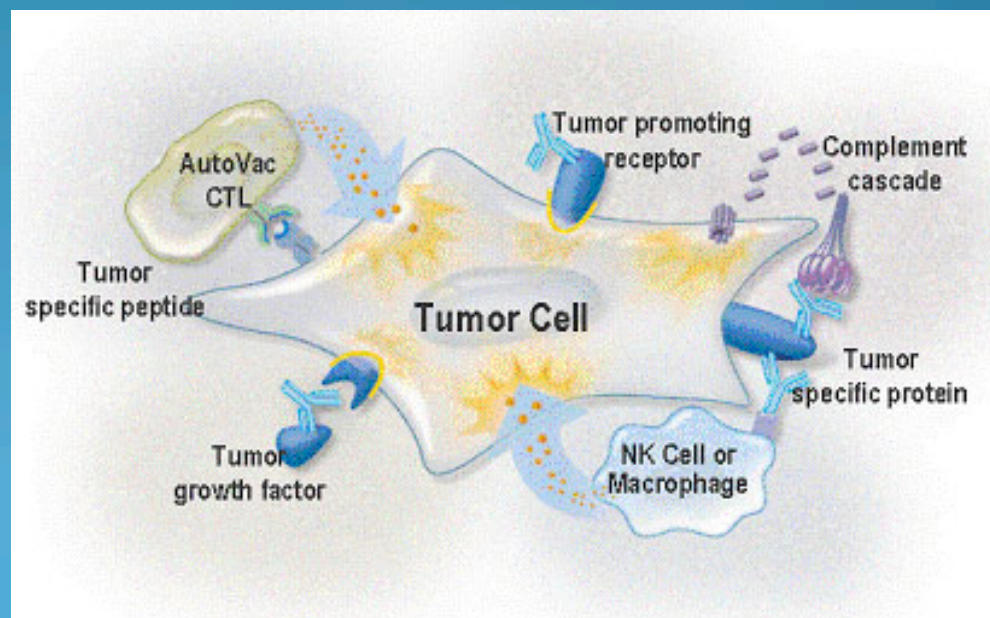
La Onyx e la Pfizer Inc. stanno sviluppando un collutorio a base di ONYX-015 con prospettive interessanti.

Nello studio condotto da Rudin e coll. 22 pazienti, dopo biopsia per valutare la mucosa ed alcuni markers come p53, ciclina D1, e Ki-67, sono stati trattati con il collutorio ottenendo una risoluzione istologica della displasia in 7/19 pazienti (37%), mentre solo in un caso il grado della displasia è peggiorato.



La terapia antitumorale può essere perseguita con:

- ❑ trattamenti tradizionali (chemioterapia, radioterapia, chirurgia)
- ❑ terapia genica
- ❑ **terapia immunologica.**





La terapia antitumorale immunologica può essere perseguita
con:

- vaccini
- potenziamento risposta immunitaria
- terapia immunitaria specifica





La terapia antitumorale immunologica può essere perseguita
con:

- vaccini
- potenziamento risposta immunitaria
- terapia immunitaria specifica





vaccini

Vaccini di I generazione

(ottenuti utilizzando lisati di cellule tumorali in toto o masse tumorali autologhe o allogeniche)

Vaccini di II generazione

(ottenuti utilizzando antigeni tumorali specifici)

potenziamento risposta immunitaria

terapia immunitaria specifica



	Antigeni	Tumore	Caratteristiche
Famiglia MAGE	MAGE 1, MAGE 3, MAGE 4, GAGE 1, GAGE 2, BAGE, RAGE, NY-ESO1, SSX2, SCP1	10–70% tumori solidi	Presenti in tumori ed assenti o poco espressi in tessuti normali con limitata espressione di MHC Class I (testicolo, placenta), targets per T cells e/o anticorpi.
Antigeni modificati	P53	50% tumori solidi	Identificate più di 120 mutazioni (la maggior parte determinano accumulo di proteina inefficace)
	Ras	Melanoma, cancro pancreas o colonretto	3 mutazioni principali in posizione 12, 13, 61, con attivazione di GTP
	Beta-catenina	Melanoma	Mutazione di una fenilalanina in serina
	BCR-abl	LMC	Translocazione
	Caspase 8	Testa-collo	Mutazione in codone di stop con allungamento del normale open reading frame di 88 aminoacidi
	MUM1	Melanoma	Mutazione in un introne/esone riconosciuto da T cells HLA B44
CDK4	Melanoma	Mutazione di una cisteina in arginina in posizione 24 (alterazione legame con epitopo di T cell HLA A2 restricted e blocco dell'interazione con l'inibitore p16)	



Problema

**Lo stesso tumore differisce notevolmente nei diversi pazienti
(es. colon cancer)**

Come si può decidere quale antigene utilizzare?

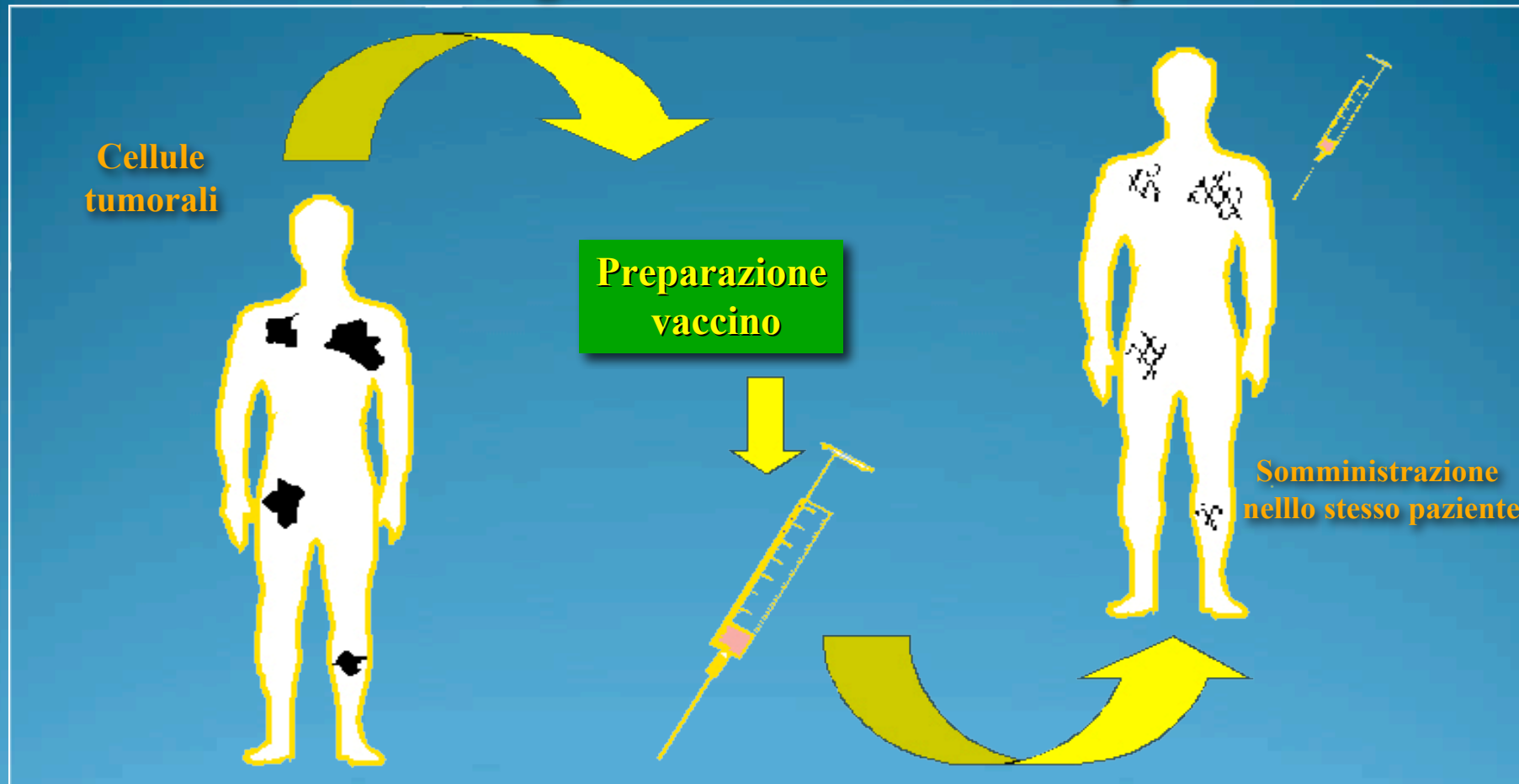


Risoluzione

**Usare il tumore che già cresce nel paziente come materiale per preparare
l'antigene immunizzante**



Vaccino cellulare autologo: Cellule Pseudo-Vive o completamente uccise



Aptenizzazione delle proteine tumorali



La terapia antitumorale immunologica può essere perseguita

con:

- vaccini
- potenziamento risposta immunitaria
- terapia immunitaria specifica





Sono in corso trials clinici che cercano di potenziare la risposta immunitaria nel carcinoma orale:

Una serie iniziale di 60 pazienti è stata trattata con iniezioni di interleukina-2 ricombinante (rIL-2) in associazione con chirurgia e radioterapia per indurre una risposta antiflogistica antitumore.

De Stefani, A., G. Valente, et al.

Treatment of oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma with perilymphatic interleukin-2: clinical and pathologic correlations.

J Immunother Emphasis Tumor Immunol 1996; 19:125-33.



La terapia antitumorale immunologica può essere perseguita

con:

- vaccini
- potenziamento risposta immunitaria
- terapia immunitaria specifica**





Condizione	Farmaco	Fase
Head and Neck Cancer	Cetuximab (monoclonal antibody for EGFR)	Fase III

L'associazione cetuximab - radioterapia mostrava un aumento dal 48% al 56% della percentuale di controllo loco-regionale della malattia a 2 anni rispetto alla sola radioterapia.

Attualmente il cetuximab risulta essere l'unico farmaco biologico approvato dalla FDA (Food and Drugs Administration) Americana per il trattamento dei tumori testa-collo (in combinazione con la radioterapia).

Bonner JA, Harari PM, Giralt J et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 2006; 354: 567-78.



Condizione	Farmaco	Fase
Carcinoma di labbro e cavo orale in III-IV stadio o recidiva	ZD 1839 (Iressa, inibitore EGFR) Cisplatin Radiation Therapy	Fase I Fase II

Gefinitib e Erlonitib si sono dimostrati attivi nei confronti dei carcinomi squamocellulari della regione testa-collo metastatici. La somministrazione orale di Gefinitib 500 mg/die ha portato ad una percentuale di risposta dall' 8% all' 11% ed una sopravvivenza media da 6 a 8 mesi

Cohen EE, Rosen F, Stadler WM et al. Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. J Clin Oncol 2003; 21: 1980-7.



Condizione	Farmaco	Fase
Head and Neck Cancer (stage III o stage IV)	bevacizumab erlonitib	Fase II

Erlonitib è stato finora associato a docetaxel e cisplatino, ottenendo una percentuale di risposta del 66% senza un aumento significativo della tossicità rispetto al regime di monoterapia.

E' noto che l'upregulation del VEGF potrebbe essere alla base della resistenza nei confronti della terapia anti EGFR. Inibendo l'attivazione dei recettori dell'EGF e del VEGF con erlonitib e bevacizumab, si osservava un significativo miglioramento delle risposte cliniche.

Cohen EE, Davis DW, Karrison TG et al. Erlotinib and bevacizumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck: a phase I/II study. Lancet Oncol 2009; 10: 247-57.



FNOMCeO - CAO

Progetto di aggiornamento sul Carcinoma orale
C.A.O. – S.I.P.M.O.- S.I.O.C.M.F.

Autori:

Andrea Santarelli
Lorenzo Lo Muzio

Università degli Studi di Foggia
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dipartimento di Scienze Chirurgiche

*Corso di Laurea in Odontoiatria e Protesi Dentaria
Presidente: Prof. Lorenzo Lo Muzio*

