UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN ONCOLOGIA

XXIV CICLO

Coordinatore: Prof.ssa F. Stivala

---

Dott.ssa ALESSANDRA TESTONI BLASCO di SCIACCA

# Metalloproteasi 9, TIMP-1 e Osteopontina quali possibili biomarcatori del carcinoma dell'endometrio

---

TESI DI DOTTORATO

---

Tutor: Chiar.ma Prof.ssa Maria Clorinda Mazzarino  Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa F. Stivala

---

---

Anno accademico 2010-2011

**INDICE**


| | |
|---|---|
| Obiettivo dello studio sperimentale | pag. 1 |
| Carcinoma dell'endometrio | pag. 3 |
| Marcatori tumorali | pag. 32 |
| Metalloproteasi | pag. 34 |
| Metalloproteasi 9 | pag. 44 |
| Inibitori delle Metalloproteasi | pag. 58 |
| Osteopontina | pag. 61 |
| Materiali e Metodi | pag. 79 |
| Risultati e discussione | pag. 84 |
| Conclusioni | pag. 92 |
| Bibliografia | pag. 94 |

# OBIETTIVO DELLO STUDIO SPERIMENTALE

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'esistenza di una diversa espressione tissutale e periferica di alcune proteine, quali possibili biomarcatori di progressione tumorale, in donne con patologie benigne dell'endometrio, con carcinoma dello stesso, e di un gruppo di donne come controllo. Le proteine che sono state da noi ricercate sono: la metalloproteasi MMP-9, la sua proteina inibitoria TIMP-1 e l'osteopontina.

Le metalloproteasi sono una famiglia di endopeptidasi, prevalentemente del tessuto connettivo, zinco e calcio dipendenti, che hanno un ruolo fondamentale nei processi di rimodellamento tissutale, poiché partecipando alla degradazione della matrice extracellulare, regolano il comportamento cellulare.

L'osteopontina è una glicofosfoproteina che si trova in tutti i fluidi del corpo e nei componenti della matrice extracellulare, che trasporta il calcio e che può fungere da proteina di adesione; inoltre è coinvolta nei processi dell'infiammazione, specialmente nella regolazione dei macrofagi e nella genesi tumorale.

La nostra ricerca, ha avuto lo scopo di mettere le basi per la formulazione di un futuro screening che individui le donne più a rischio di sviluppare un carcinoma dell'endometrio, mediante il dosaggio di proteine che fungano da marcatori di progressione neoplastica.

Lo studio è stato preceduto da un'attenta ricerca bibliografica, dalla quale è emerso che la relazione esistente tra l'espressione di metalloproteasi, osteopontina e carcinoma endometriale è nota già da alcuni anni. Abbiamo però appreso che fino a pochi anni fa, la maggior parte degli studi scientifici riportati in letteratura, ha volto l'interesse più al

tessuto endometriale, che al sangue periferico (Di Nezza LA, 2002 - Graesslin O, 2006 a), cosa che è stata fatta negli ultimissimi tempi (Castellano G, 2008 - Dragutinovic VV, 2011).

Questo particolare ha attirato la nostra attenzione in quanto riteniamo che i risultati di uno studio sperimentale non debbano essere fine a se stessi, ma debbano mirare ad avere un riscontro nella pratica clinica. Ciò si è tradotto nella ricerca di alcune proteine, ovvero marcatori tumorali per rischio oncologico, che identifichino un rischio reale di manifestare il carcinoma dell'endometrio. Soprattutto era essenziale che la modalità per ottenere tali risultati, fosse di facile esecuzione, ripetibile nel tempo e soprattutto il meno invasiva possibile.

# CARCINOMA DELL'ENDOMETRIO

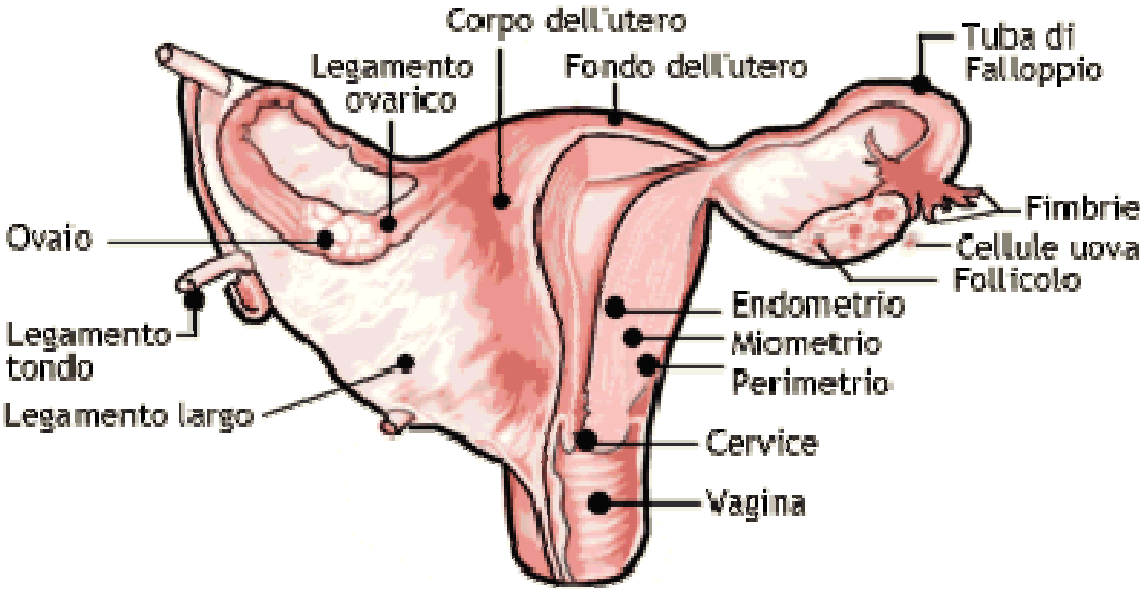
## Introduzione

Il carcinoma dell'endometrio costituisce attualmente la neoplasia emergente nel mondo occidentale,rappresentando l'8-10% di tutte le neoplasie femminili. Parallelamente si è osservata una diminuzione del carcinoma invasivo della cervice,tanto che in molti paesi industrializzati la frequenza delle suddette neoplasie mostra una tendenza a divenire sovrapponibile. In Italia, l'incidenza del carcinoma endometriale del carcinoma endometriale è pari al 5-6% dei tumori femminili con circa 4000 nuovi casi annui. Anche i tassi di mortalità più recenti dimostrano significative variazioni:negli Stati Uniti nel 1998 sono stati registratati 36100 nuovi casi con 6300 decessi attribuiti al carcinoma dell'endometrio. Se si paragonano questi dati con quelli del decennio precedente, se invece che, a quasi parità di incidenza, le morti sono più che duplicate. Ciò obbliga a considerare più criticamente la nostra condotta clinica in termini di screening, diagnosi, staging e protocolli terapeutici. Uno screening per il carcinoma dell'endometrio non è di nessun provato vantaggio. Il pap test non è utilizzabile;va osservato tuttavia che la presenza di cellule endometriali nel pap test di una donna in postmenopausa che non faccia uso di terapia sostitutiva, rappresenta un evento del tutto anomalo che richiede accertamenti ulteriori.

## Epidemiologia

Nell'ultimo ventennio il carcinoma dell'endometrio (tumore all'utero) è diventata la neoplasia pelvica piú frequente nella donna. Si stima che ogni anno in Italia si verifichino circa 5.000 nuovi casi di carcinoma dell'endometrio, corrispondenti a circa

il 15% di tutte le neoplasie. Il carcinoma dell'endometrio è il quarto per frequenza dopo quelli della mammella, del polmone e del colon. Pur essendo una malattia della postmenopausa, il 25% dei casi si verifica nelle donne in età premenopausale, e il 2% in donne con meno di 40 anni.




L'uso di contraccettivi estroprogestinici esercita un effetto protettivo proporzionale alla durata di assunzione, e persistente nel tempo per alcuni anni dopo la sospensione del farmaco. L'impiego di una terapia sostitutiva ormonale per la menopausa secondo uno schema bilanciato (con l'aggiunta cioè agli estrogeni dei progestinici) non aumenta il rischio di sviluppare la malattia. Per le pazienti affette da carcinoma della mammella in trattamento con tamoxifene è stato segnalato come un maggior rischio di sviluppare una neoplasia endometriale.

## Patogenesi

Il rischio più elevato è presente nei soggetti con:

1. Obesità
2. Menopausa tardiva e menarca precoce
3. Sindrome dell'ovaio policistico-iperestrogenismo abituale con cicli anovulatori;
4. Utilizzazione per lunghi periodi di terapie estrogeniche non associate alla somministrazione di progestinici, come per esempio accade nei soggetti che dall'età puberale in poi vengono trattati perché hanno una disgenesia gonadica.

**Fattori di rischio per il carcinoma endometriale**

| **Fattore** | **Rischio** |
|---|---|
| Obesità | 3,2-10 |
| Menarca < 11 anni | 3,9 |
| Nulliparità | 2-5 |
| Menopausa > 53 anni | 2,6 |
| Terapia estrogenica in menopausa | 2-12 |
| Terapia con tamoxifene | 1,7-7,5 |
| Pregresso carcinoma mammario | 1,7-3,7 |
| Diabete | 1,8-2-7 |
| Ipertensione | 1,2-1-7 |
| Fumo | 0,5 |

Il rischio più significativo è comunque rappresentato dalla obesità, dalla menopausa tardiva e dall'uso prolungato di estrogeni e tale rischio si accentua se si associa più di un fattore, per esempio eccesso di peso con l'uso prolungato di estrogeni. Circa il ruolo che gli estrogeni possono avere nell'insorgenza di questa neoplasia sembra accertato che sia la produzione endogena di questi steroidi, non controbilanciata dalla ciclica produzione di progesterone, sia la somministrazione esogena per lungo tempo di soli estrogeni possono favorire, in un soggetto geneticamente predisposto, la formazione dell'adenocarcinoma endometriale attraverso lo stimolo proliferativo che in queste condizioni si determina sulla mucosa uterina per cui ne consegue uno stato iperplastico.

## Istopatologia

Il carcinoma dell'endometrio può insorgere in qualsiasi punto della cavità del corpo uterino e macroscopicamente può presentarsi sotto due forme:

- *una forma circoscritta*
- *una forma diffusa.*

La **forma circoscritta** di solito appare come una formazione polipoide e più raramente come una ulcerazione od un rilievo nodulare limitato ad una precisa area endometriale. Questa proliferazione, a differenza dei polipi endometriali benigni è irregolare, friabile, con più accentuati fatti di necrosi e/o emorragici.

L'infiltrazione in profondità nel miometrio può provocare una erosione progressiva dello spessore muscolare fino ad affiorare alla superficie peritoneale. La **forma diffusa** occupa di solito gran parte della cavità uterina e può anche essere dovuta all'estendersi di una forma primitivamente circoscritta, che inizia per lo più nel terzo superiore della cavità, oppure può essere dovuta all'origine multicentrica del tumore. L'infiltrazione

miometriale nelle forme diffuse o proliferative è meno frequente che nelle forme ulcerative.

La classificazione istologica ufficiale del carcinoma dell'endometrio prevede sette istotipi: l'adenocarcinoma endometrioide, i carcinomi sieroso, a cellule chiare, mucinoso, squamocellulare, indifferenziato e misto.

**Classificazione istologica del carcinoma endometriale secondo una versione della WHO e ISGYP**

1. adenocarcinoma endometrioide
2. carcinoma mucinoso
3. carcinoma sieroso
4. carcinoma a cellule chiare
5. carcinoma indifferenziato
6. carcinoma squamoso
7. tipi misti
8. carcinomi metastatici

La forma piú frequente è l'**adenocarcinoma endometrioide o endometriale** che rappresenta circa il 70-80% del totale. Per lo più si reperiscono forme abbastanza differenziate, con ghiandole tubulari rivestite da cellule stratificate contenenti scarsa mucina. Esiste anche una forma di adenocarcinoma secretivo. Questa forma è particolarmente frequente nelle donne più giovani. Altre varietà meno frequenti sono l'**adenocarcinoma secernente mucina** (simile all'adenocarcinoma cervicale) e l'**adenocarcinoma a cellule chiare**, di raro riscontro nell'endometrio. Nell'ambito dell'adenocarcinoma endometriale esistono tre gradi di differenziazione (G1, G2 e G3),

in rapporto all'architettura e alle atipie citologiche. I gradi piú frequenti sono il G1 ed il G2, mentre il G3 incide per circa il 10% dei casi. Una certa variabilità intersoggettiva nella valutazione istologica del grading è comunque inevitabile. Istotipo e grading identificati sul materiale bioptico in alcuni casi possono essere modificati all'esame del pezzo operatorio. Poiché il grado di differenziazione e soprattutto il grado nucleare è un importante fattore prognostico occorre sempre individuare questa caratteristica. Ci sono tre gradi di adenocarcinoma. In base ai dati epidemiologici e clinici il carcinoma dell'endometrio viene distinto in due categorie in base alla patogenesi, una correlata agli estrogeni ed una indipendente. La prima categoria è rappresentata dall'adenocarcinoma endometrioide con le sue varianti. Il carcinoma estrogeno-correlato ha alcune caratteristiche: insorgenza preferenziale in età pre o perimenopausale; associazione con un'esposizione eccessiva a estrogeni esogeni (terapia ormonale sostitutiva non bilanciata) o endogeni; prognosi di solito favorevole. Istologicamente si osserva un'iperplasia dell'endometrio; il grado è piú spesso bene o moderatamente differenziato e l'invasione dell'endometrio è in genere limitata.

La seconda categoria patogenetica è rappresentata dal carcinoma sieroso, dal carcinoma a cellule chiare e dal carcinoma adenosquamoso e indifferenziato. Questi costituiscono un terzo dei casi, non sono associati con l'esposizione ad estrogeni, sono tipici dell'età postmenopausale e hanno una prognosi sfavorevole. Istologicamente si osserva una atrofia dell'endometrio. La neoplasia è spesso poco differenziata, ed è comune un'estesa infiltrazione del miometrio. La discriminazione tra le due categorie si basa su criteri morfologici e non sulla situazione endocrina della paziente. La valutazione ormonale non ha valore, poiché i livelli plasmatici di androstenedione, estrone, estradiolo e testosterone nelle pazienti in postmenopausa, con e senza carcinoma dell'endometrio, sono analoghi a quelli riscontrati in donne comparabili per peso ed età.

## Diffusione

La diffusione del carcinoma dell'endometrio avviene per estensione diretta, per via linfatica e per via ematica. Per **estensione diretta** il tumore può estendersi verso il miometrio, il canale cervicale e l'esocervice, verso le tube, l'ovaio, la vescica e la cavità peritoneale. L'estensione al perimetrio è considerata malattia extra-uterina. L'estensione verso il canale cervicale e l'esocervice classifica la neoplasia al secondo stadio. L'estensione diretta alle tube (invasione del tratto intramurale) non modifica lo stadio. L'estensione verso la vescica ed il retto è rara: essa fa classificare il tumore allo stadio IV. L'entità dell'invasione del miometrio modifica lo stadio, a seconda che il miometrio non sia ancora invaso, sia infiltrata la metà dello spessore del muscolo uterino o sia infiltrata più della metà di questo spessore.

Lentamente il miometrio può essere eroso sino alla sierosa ed a questo punto si può avere uno sfaldamento di cellule neoplastiche nella cavità peritoneale. Questo fatto rende positivo l'esame citologico sul fluido peritoneale o sul lavaggio peritoneale, che si deve praticare al momento dell'intervento attuato a scopo terapeutico appena aperto l'addome. La positività della citologia peritoneale ovviamente è un dato che aggrava la prognosi. La presenza di cellule neoplastiche in cavità peritoneale può anche spiegare l'insorgenza di metastasi sulla superficie ovarica. Tali metastasi però si verificano soprattutto per via linfatica. La **diffusione per via linfatica** consente alle cellule maligne di raggiungere il parametrio, la vagina, le tube, le ovaie ed i linfonodi retroperitoneali, pelvici e lomboaortici. L'interessamento della vagina oltre che per via linfatica può avvenire per estensione diretta. La diffusione alle ovaie e alla parte non intramurale delle tube avviene attraverso i linfatici del mesoovario e del mesosalpinge. Metastasi linfonodali si riscontrano nel 5-15% delle pazienti con tumore limitato al

corpo uterino e nel 20-30% delle pazienti con tumore esteso alla cervice. Le stazioni pelviche sono le piú colpite. Metastasi isolate ai linfonodi lomboaortici sono rare (0,5-3%), ma il rischio aumenta in caso di positività dei linfonodi pelvici.

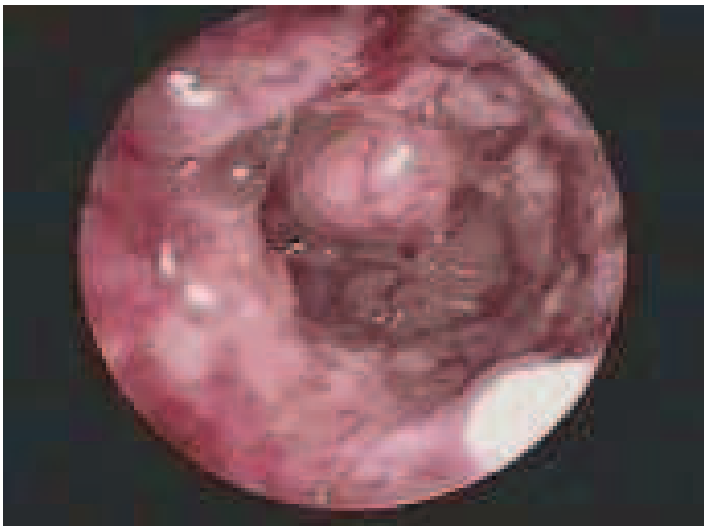
Le **metastasi per via ematogena** avvengono piuttosto tardivamente e si verificano al polmone (2-3 ¾ dei casi), alle ossa, al fegato, alla vagina per via venosa retrograda ed in altri organi. Le metastasi per via linfatica e per via ematogena sono tanto più frequenti quanto più il tumore è poco differenziato (G3) e quanto più estesa è l'invasione del miometrio.

## Diagnosi precoce

Uno screening di massa sulla popolazione femminile asintomatica in età pre-menopausale e postmenopausale, per la diagnosi precoce del carcinoma endometriale, come si effettua per il carcinoma cervicale tramite il Pap-test, non è attuabile. Per avere un esame citologico valido e predittivo della situazione endometriale il prelievo vaginale, esocervicale ed endocervicale non è sufficiente. Si ha infatti un'incidenza di falsi negativi di circa il 40-50% in quanto le cellule endometriali esfoliate, avendo subito l'azione dell'ambiente vaginale e/o avendo impiegato alcuni giorni per giungere a livello della cervice, presentano alterazioni per cui perdono le caratteristiche che permettono di differenziare la cellula normale da quella neoplastica. La metodica migliore per il controllo periodico dell'endometrio e dell'endocervice è comunque quella che si serve dell'isteroscopio e del microisteroscopio di Hamou (diametro 4 mm) che permettono sia di avere una visione panoramica della mucosa del corpo uterino e del canale cervicale sia, previa colorazione vitale, di avere una visione microscopica della disposizione cellulare in superficie, per cui si ha un'elevatissima probabilità di

individuare anche piccole aree carcinomatose e di guidare il prelievo bioptico in modo mirato. La valutazione dello spessore della rima endometriale mediante ecotomografia con sonda endovaginale permette la diagnosi differenziale tra endometrio atrofico endometrio iperplastico.

Lo spessore medio della rima endometriale in età postmenopausale è 1-3 millimetri. Nelle donne in terapia ormonale sostitutiva in menopausa lo spessore della rima endometriale è circa 5-6 mm. Nelle donne in trattamento con tamoxifen, invece, la valutazione ecografica dello spessore della rima endometriale, pur diffusamente impiegata, è gravata da un alto numero di falsi positivi che ne limitano il valore predittivo. La citologia endometriale, mediante aspirazione, lavaggio o abrasione diretta della cavità, non trova indicazione nella paziente asintomatica. Tecniche di prelievo istologico ambulatoriale mininvasive (aspirazione o biopsia in striscia) eseguite alla cieca non forniscono risultati di attendibilità pari a quella del raschiamento endouterino, ma hanno un'indicazione specifica dopo l'esame isteroscopico. I metodi di aspirazione forniscono comunque materiale piú abbondante e rappresentativo rispetto alla biopsia in striscia. L'isterografia può essere utile per definire la grandezza e la forma della cavità uterina e fornisce immagini abbastanza tipiche in caso soprattutto di carcinoma vegetante. In qualche paziente evidenzia l'invasione del miometrio e dell'endocervice. Non è tuttavia un mezzo consigliabile sia per la diagnosi precoce sia per la stadiazione dei tumore per il rischio che comporta di disseminazione nel peritoneo e nel canale cervicale delle cellule tumorali.



*Aspetto isteroscopico di carcinoma endometriale*

## Sintomatologia e diagnosi clinica

Purtroppo nel carcinoma endometriale i sintomi clinici compaiono di solito tardivamente; essi comprendono:

1. **perdite ematiche** di varia entità e tipo (rosso vivo, rosso cupo, rosa). Ai controllo con lo speculum si constata che queste perdite provengono dall'interno del canale cervicale e non dalla portio o dalla parete vaginale. Le metrorragie devono destare particolare sospetto se si presentano nella post-menopausa, essendo questa età preferita dal tumore. Debbono però sempre indurre ad un accertamento istologico (tramite l'isteroscopia o l'esame frazionato della cavità uterina) anche se vengono notate in età riproduttiva o in donne molto giovani;

2. **leucoxantorrea:** si tratta di perdite bianco-giallastre maleodoranti dovute ai fenomeni di congestione che si associano al tumore e talora ai fatti di necrosi e colliquativi che si verificano nelle vegetazioni neoplastiche;
3. **dolore:** come nel caso del cancro cervicale anche per quello dell'endometrio il dolore compare tardivamente e quando la neoplasia coinvolge organi pelvici o addominali (sigma, intestino tenue, vescica o retto).In fase precoce si può avere tuttavia una lieve sintomatologia dolorosa dovuta alla distensione dell'utero provocata dal proliferare delle vegetazioni tumorali ed alle contrazioni uterine che questa distensione risveglia.

In pratica la diagnosi di carcinoma endometriale viene il più delle volte fatta perché la donna ha visto comparire una metrorragia e si è recata dal medico. Occorre quindi che ogni donna sappia che una perdita ematica, anche lievissima, se compare al di fuori del periodo mestruale, e tanto più se compare nella post-menopausa, può essere la prima manifestazione di un carcinoma endometriale in evoluzione.

## Stadiazione

Una volta diagnosticato un carcinoma dell'endometrio, bisogna condurre alcuni accertamenti per valutare la diffusione della malattia:

1. esame clinico;

2. colposcopia con studio delle pareti vaginali;
3. valutazione del canale cervicale (isteroscopia o raschiamento frazionato, se non eseguiti in precedenza);
4. ecografia transvaginale per valutare l'infiltrazione endometriale.

La profondità dell'invasione del miometrio, oltre che con l'ecografia transvaginale, può essere definita mediante la risonanza magnetica, che valuta anche la situazione della pelvi nel suo complesso. In presenza di una sintomatologia riferibile ad altri distretti, sono indicati esami specifici. La valutazione del retroperitoneo, non essendo attendibile con le attuali tecniche d'imaging, andrà fatta, nel caso, durante l'intervento. Nei casi nei quali si ritiene opportuno si possono aggiungere: l'urografia, la rettocolonscopia ed il clisma opaco a doppio contrasto, la cistoscopia, la laparoscopia, la scintigrafia epatica e scheletrica. Lo stadio clinico viene determinato secondo la classificazione F.I.G.O. (ottobre 1988) e quella dell'Unione internazionale contro il cancro (UICC) definita come TNM (1992). La prognosi è infatti strettamente correlata con questa ulti ma classificazione mentre la classificazione clinica non può fornire quell'insieme di elementi che permettono di valutare la diffusione del tumore con esattezza.

## Classificazione FIGO (1988) E TNM (1992)

| | | |
|---|---|---|
| **Ia** | Tumore limitato all'endometrio | **T1A** |
| **Ib** | Tumore con invasione del miometrio= ½ | **T1B** |
| **Ic** | Tumore con invasione del miometrio >½ | **T1C** |
| **IIa** | Tumore con interessamento ghiandolare endocervicale | **T2A** |
| **IIb** | Tumore con interessamento dello stroma cervicale | **T2B** |
| **IIIa** | Tumore con interessamento della sierosa, e/o degli annessi e/o con citologia peritoneale positiva per cellule tumorali maligne | **T3A** |
| **IIIb** | Metastasi vaginali | **T2B** |
| **IIIc** | Metastasi ai linfonodi pelvici e/o paraaortici | **T indifferente** |
| **IVa** | Tumore con invasione della vescica e/o del retto | **T4** |
| **IVb** | Metastasi a distanza, inclusive delle metastasi endo-addominali e/o dei linfonodi inguinali | **T indifferente N indifferente M1** |

La classificazione FIGO 1988 specifica che:

- il carcinoma del corpo dell'utero viene stadiato chirurgicamente, pertanto non sono più applicabili le procedure usate nel passato per la determinazione dello stadio, come il raschiamento frazionato per differenziare lo stadio I dallo stadio II;
- un certo numero di pazienti con carcinoma dell'endometrio è trattato in prima istanza con radioterapia: in questi casi va usata la stadiazione clinica della FIGO (1971), specificando questo tipo di stadiazione.

La classificazione TNM è analoga alla classificazione FIGO. Nel "TNM Supplement 1993. "A Commentary on Uniform Use" vengono apportate le seguenti specificazioni:

1. T3A o FIGO IIIa include i casi con interessamento discontinuo degli annessi o della sierosa pelvica.
2. L'invasione della parete della vescica o del retto è classificata T2B. L'invasione della mucosa della vescica o del retto è classificata T4.
3. L'estensione clinica alla/e parete/i della pelvi è classificata T3B.

Le *linee guida* più recenti della sottocommissione **FIGO** per la stadiazione **(2000)** raccomandano per la stadiazione chirurgica:

1. un'incisione verticale;
2. il prelievo di liquido libero peritoneale o di lavaggio;
3. l'accurata esplorazione della pelvi e dell'intero addome;
4. l'ispezione e la palpazione delle catene linfonodali pelviche e lombo-aortiche;
5. la procedura chirurgica standard di isterectomia totale extrafasciale con annessiectomia bilaterale (anche ad ovaie apparentemente normali);
6. è espressamente sottolineato che non è obbligatoria anzi è dubbia l'utilità dell'asportazione del colletto vaginale;
7. per quanto attiene la valutazione linfonodale pelvica non è espressamente chiarito se la linfoadenectomia debba essere sistematica e limitata ad un sampling linfonodale o alla semplice palpazione;

8. per quanto riguarda i linfonodi aortici è suggerito effettuare un sampling nei casi sospetti di linfonodi ingrossati in sede aortica o iliaca comune, nei casi con annessi positivi, nei casi con positività sulle linfoghiandole pelviche.

Anche nelle varianti istologiche a cellule chiare, sieroso-papillifero e carcinosarcoma è suggerito provvedere al campionamento dei linfonodi aortici per la particolare storia naturale di queste neoplasie.

## Prognosi del carcinoma dell'endometrio

La prognosi del carcinoma dell'endometrio è direttamente correlata alla presenza o assenza di fattori di rischio intrauterini o extrauterini facilmente determinabili. ***Fattori prognostici intrauterini*** sono: il tipo istologico, il grado di differenziazione, la profondità dell'infiltrazione miometriale, l'estensione all'istmo e alla cervice e l'invasione degli spazi vascolari. ***Fattori prognostici extrauterini*** sono: le metastasi agli annessi, la diffusione intraperitoneale, la citologia peritoneale positiva, le metastasi linfonodali pelviche e il coinvolgimento linfonodale paraaortico. La misura della cavità uterina era precedentemente ritenuta un fattore di rischio e faceva parte della vecchia stadiazione clinica. Studi successivi hanno dimostrato che essa non è un fattore di rischio indipendente, ma è correlata con la prognosi solo se l'enlargement dipende dall'infiltrazione miometriale del tumore.

## Istotipo

L'aggressività dell'adenocarcinoma endometriale, il tipo istologico più frequente, è collegata solamente al suo grado di differenziazione. I tipi istologici che,

indipendentemente dal grado, non hanno una prognosi favorevole sono, in ordine di frequenza: il sieroso-papillifero, a cellule chiare, indifferenziato e squamoso. Fortunatamente, questi tipi sono infrequenti. A prescindere dallo stadio, la sopravvivenza globale (OS) di questo gruppo è meno del 33 %.

Il carcinoma sieroso-papillifero rappresenta meno del 10% di tutti i carcinomi endometriali; è più frequente nelle donne più anziane e mostra un comportamento molto aggressivo attraverso una precoce invasione linfatica del miometrio, e spesso presenta un'infiltrazione intraepiteliare più frequente dell'adenocarcinoma endometriale. La valutazione della sede della recidiva nell'addome superiore o in siti distanti, suggerisce che questi sottotipi istologici non favorevoli rappresentano una malattia sistemica.

## **Grado e infiltrazione miometriale** .

Il grado di differenziazione istologica è uno dei più sensibili indicatori della diffusione del tumore Infatti, circa il 50 % delle lesioni di grado 3 hanno una infiltrazione miometriale della metà esterna, con un interessamento linfonodale pelvico del 34 % e paraaortico del 23 %. Tuttavia, esistono delle eccezioni: il 10 % dei G1 hanno un'invasione miometriale profonda e il 7 % dei G3 sono limitate all'endometrio; sebbene solo il 2,8 % di tutti i G1 hanno interessamento linfonodale pelvico e il 1,7 % paraaortico, l'11 % e il 6 %, rispettivamente, hanno linfonodi positivi se c'è infiltrazione miometriale profonda. Il grado di differenziazione tumorale ha un profondo effetto sulla sopravvivenza con prognosi molto sfavorevole per i G3 verso i G1-G2.

## Estensione all'istmo e alla cervice

L'estensione diretta al canale cervicale rappresenta una via di diffusione relativamente frequente (circa il 20% dei casi). Essa assume un ruolo prognostico sfavorevole in quanto può condizionare:

1. la diffusione attraverso la ricca rete linfatica propria della cervice uterina;
2. la diffusione, per via linfatica o per estensione diretta, alle strutture parametriali;
3. la diffusione vaginale.

A tal fine è importante definire se l'estensione della neoplasia al canale cervicale interessa solo la mucosa o se è presente e in che grado l'infiltrazione delle strutture muscolari della cervice uterina

## Invasione dello spazio vascolare

L'invasione dello spazio vascolare o l'interessamento dello spazio capillare si verifica in circa il 15 % dei casi: i linfonodi pelvici sono positivi nel 27 % dei casi rispetto al 7 % quando l'invasione è assente; i linfonodi paraaortici sono interessati nel 19 % dei casi rispetto al 9 % in assenza di invasione.

## Interessamento degli annessi

Il 6% delle pazienti al I stadio clinico o II stadio occulto presentano la diffusione tumorale agli annessi. Di queste, il 32% hanno metastasi linfonodali pelviche, comparato con l'8% se l'interessamento annessiale non è presente; il 20% hanno metastasi paraaortiche, contro il 5% se non c'è interessamento annessiale. Il

coinvolgimento microscopico degli annessi ha una migliore prognosi rispetto ad un grosso interessamento della stessa struttura.

## Diffusione intraperitoneale

La diffusione intraperitoneale macroscopica, senza metastasi agli annessi, si correla strettamente all'interessamento linfonodale pelvico e paraaortico: il 51% delle pazienti presenta positività linfonodale pelvica, e solo il 7% delle pazienti senza diffusione tale positività. La frequenza relativa della positività linfonodale paraaortica per pazienti con e senza diffusione intraperitoneale è del 23% e 4%, rispettivamente.

## Citologia peritoneale

Il 12-15% delle pazienti sottoposte allo staging chirurgico hanno la citologia peritoneale positiva. Di queste, il 25% presentano metastasi ai linfonodi pelvici, e il 19% ai linfonodi paraaortici. Inoltre, il 35 % delle pazienti con malattia extrauterina (annessi, linfonodi, diffusione intraperitoneale) hanno il washing positivo. Comunque, il 4-6% delle pazienti con washing positivo non hanno evidenza di malattia extrauterina.

## Linfonodi pelvici e paraaortici

La disseminazione metastatica ai linfonodi pelvici e paraaortici è stata correlata con lo stadio della malattia, il grado di differenziazione e l'invasione miometriale. Molti studi hanno confermato che, il grado meno differenziato, ha una maggiore tendenza all'invasione miometriale profonda e susseguentemente c‘è una più alta percentuale di coinvolgimento linfonodale pelvico e paraaortico e una diminuzione della percentuale

di sopravvivenza a 5 anni (dall'85-90% quando ciò è assente, al 60-70% quando l'infiltrazione miometriale è maggiore della sua metà).

## Età

Sembra che l'età avanzata alla diagnosi condizioni la prognosi perché le pazienti presentano neoplasie con stadio più avanzato, con maggior grado di infiltrazione miometriale, grading più alto e tipi istologici più aggressivi (adenocarcinoma sieroso-papillifero e a cellule chiare); inoltre in tali casi l'approccio terapeutico è meno aggressivo e la condizione medica è peggiore rispetto alle pazienti più giovani, determinando percentuali di sopravvivenza a 5 anni più basse. ***In conclusione***, in accordo con i fattori prognostici i pazienti possono essere suddivisi come segue:

- **basso rischio** (grado 1 o 2 e < 50% di invasione miometriale).
- **rischio intermedio** (grado 3 con invasione miometriale > 50%, con nessuna evidenza di malattia extrauterina, invasione cervicale, o invasione vascolare).
- **Alto rischio** (invasione miometriale profonda, coinvolgimento della cervice, metastasi linfonodali pelviche o paraaortiche e alcuni tipi istologici).

## Terapia

Il **trattamento primario** del carcinoma dell'endometrio è **chirurgico** e consiste nell'isterectomia totale con ovarosalpingectomia bilaterale e colpectomia del terzo superiore per via laparotomica. Per le pazienti, nelle quali per condizioni generali (età avanzata) viene esclusa la fattibilità della chirurgia per via addominale deve essere

valutata, prima di altre scelte terapeutiche, l'operabilità per via vaginale. La scelta chirurgica come approccio terapeutico di prima istanza si basa sulla considerazione che la maggior parte delle neoplasie sono confinate al corpo uterino e che la chirurgia può essere di per sé atto terapeutico sufficiente e definitivo; consente inoltre l'identificazione dei fattori di rischio definiti dalla stadiazione patologica. Quando la chirurgia non comprende la linfadenectomia o il sampling linfonodale, può essere considerata accettabile la previsione dell'interessamento metastatico ai linfonodì regionali basata sui fattori di rischio legati alla neoplasia primitiva, sulla scorta di considerazioni statistiche, infatti l'interessamento linfonodale pelvico e lombo-aortico è in rapporto diretto con il grado di differenziazione e con la profondità di infiltrazione del miometrio. E' inferiore al 5% quando la neoplasia è confinata all'endometrio; l'invasione del terzo interno del miometrio e un grading 2 si associano a coinvolgimento dei linfonodi pelvici nel 5-9% dei casi e dei linfonodi para-aortici nel 5%. Quando c'è invasione della metà esterna del miometrio o un grading 3, l'invasione dei linfonodi pelvici varia dal 18 al 25% con il 11-17% di interessamento paraaortico.
Dopo l'intervento chirurgico e prima di eventuali terapie adiuvanti può essere indicato programmare accertamenti volti ad individuare alterazioni postchirurgiche con particolare riferimento ad alterazioni della minzione, della funzione renale o intestinale.
La **radioterapia radicale esclusiva** è indicata nelle pazienti con neoplasia in fase localmente avanzata, clinicamente e strumentalmente accertata in modo inequivocabile, ovvero nelle pazienti inoperabili per condizioni patologiche associate.

1. **Terapia allo Stadio I**

   La semplice isterectomia per via laparotomica con ovarosalpingectomia

bilaterale ed asportazione di un colletto vaginale di 1-2 cm, preceduta dal lavaggio peritoneale per l'esame citologico, è il trattamento adeguato nelle pazienti con malattia allo Stadio Ia con:

- elevato grado di differenziazione (GI);
- penetrazione miometriale assente;
- linfonodi negativi alla verifica intraoperatoria;
- citologia peritoneale negativa.

Sono in queste condizioni circa il 40-50% delle pazienti con carcinoma endometriale. In questi casi la sopravvivenza a cinque anni si avvicina al 98% e la prognosi migliore sembrano averla le pazienti in età premenopausale.

I tumori con invasione limitata alla metà interna del miometrio (stadio Ib), se il grado di differenziazione è favorevole (G1-G2) non richiedono un ulteriore trattamento, mentre, nei casi con grado di differenziazione o istotipo sfavorevoli, viene generalmente impiegato un trattamento adiuvante. Nei tumori che invadono la metà esterna del miometrio (Ic), qualunque sia l'istotipo e il grado di differenziazione, viene generalmente impiegata una terapia adiuvante.

2. **Terapia allo Stadio II**

Lo Stadio II del cancro endometriale è rappresentato da quella situazione nella quale il tumore si è esteso al collo uterino. Nell'ambito di questa estensione si debbono però distinguere le invasioni della sola mucosa cervicale (stadio IIa), la microdiffusione al solo stroma e/o al muscolo cervicale ed il coinvolgimento massivo di questo tratto dell'utero (stadio

IIb). Queste tre diverse condizioni implicano infatti una prognosi diversa. Non sempre è agevole diagnosticare in modo sicuro questo stadio. Infatti prima dell'intervento, il curettage frazionato dell'endocervice e della cavità del corpo presenta sovente dei falsi positivi, dovuti a frustoli di mucosa endometriale cancerizzati caduti nel canale cervicale e prelevati perciò in questa zona. Questa contaminazione porta a sovrastadiare la paziente classificandola allo Stadio II, mentre in realtà ha uno Stadio I. Si possono avere anche falsi negativi se chi pratica il raschiamento endocervicale non asporta mucosa da ogni punto di questo canale.

La prognosi è migliore nei casi con invasione limitata alla mucosa della cervice, peggiore nei casi di invasione molto estesa del muscolo cervicale. La terapia allo Stadio II dopo intervento chirurgico dovrebbe consistere in un'irradiazione esterna della pelvi completata successivamente da una irradiazione del fondo vaginale. Se durante l'intervento era stata fatta una linfoadenectomia o per lo meno il controllo intraoperatorio dei linfonodi pelvici e paraaortici e se detti linfonodi sono risultati istologicamente o clinicamente negativi, l'irradiazione esterna sarà solo pelvica. Al momento non vi esistono evidenze sull'utilità di un trattamento radiante preoperatorio.

3. **Terapia allo Stadio III**

Nei casi appartenenti a questo stadio (il cancro è uscito dall'utero ma è ancora confinato alla pelvi e/o vi sono metastasi ai linfonodi pelvici e/o paraaortici) occorre distinguere varie situazioni ma occorre tener presente che la positività dei linfonodi è elevata e varia dal 30 al 50%. Le differenti

caratteristiche della diffusione neoplastica negli stadi IIIa, IIIb e IIIc possono richiedere una terapia adiuvante personalizzata. La radioterapia esterna è stata ampiamente utilizzata negli stadi IIIa e IIIb. Vi è molta discussione circa il trattamento delle pazienti classificate in stadio IIIa soltanto per la positività della citologia peritoneale. Molti autori ritengono che questa ultima non necessiti di un trattamento adiuvante in assenza di malattia extrauterina o di altri fattori prognostici sfavorevoli.

Analogamente, secondo le linee guida della Società Italiana di Oncologia Ginecologica, la citologia peritoneale di per sé non dovrebbe influenzare le decisioni terapeutiche. Nello stadio IIIc la radioterapia esterna e/o la chemioterapia sono state variamente impiegate quale trattamento adiuvante. Le pazienti con invasione della mucosa vescicale o rettale alla diagnosi, sottoposte un tempo a radioterapia primaria o a chirurgia eviscerativa, sono attualmente trattate con chemioterapia neoadiuvante seguita da radioterapia di consolidamento.

4. **Terapia allo Stadio IV**

Per fortuna questa condizione viene diagnosticata in una paziente con carcinoma endometriale piuttosto raramente e di solito si tratta delle varietà più aggressive della neoplasia (carcinoma squamo-adenomatoso, carcinoma indifferenziato, ecc.). In questo stadio l'irradiazione ha per lo più valore palliativo avendo lo scopo di diminuire le metrorragie ed i dolori. Molte di queste pazienti possono venire trattate solo con alte dosi di progestinici e/o con la polichemioterapia.

## Indicazione ai trattamenti adiuvanti

Il trattamento adiuvante più diffuso e accettato è la radioterapia esterna sulla pelvi, la cui efficacia è dimostrata però solo per il controllo locale della malattia. La radioterapia adiuvante è indicata in funzione del rischio di recidive pelviche e/o di recidiva vaginale. Nel primo caso il trattamento è costituito dall'irradiazione con fasci esterni; nel secondo caso dalla brachiterapia endovaginale. In presenza di entrambi di rischio, le due metodiche vanno associate. Il rischio di recidiva vaginale è correlato all'entità della colpectomia e agli stessi fattori di rischio condizionanti l'indicazione all'irradiazione pelvica. I tumori con invasione dello stroma cervicale (stadio IIb) non sottoposti a chirurgia adeguata (isterectomia radicale con annessiectomia bilaterale e linfadenectomia pelvica) devono essere trattati con radioterapia postoperatoria. Nei tumori con diffusione alla tuba e all'ovaio (stadio IIIa) non è documentata l'utilità di un trattamento adiuvante post-chirurgico, anche se i dati delle serie retrospettive sembrano suggerire un trattamento chemioterapico soprattutto per gli istotipi sfavorevoli (sierosopapillifero, adenosquamoso e a cellule chiare). Nei tumori con coinvolgimento della vagina (stadio IIIb) il trattamento radioterapico è il trattamento di scelta. Nei tumori con coinvolgimento linfonodale (stadio IIIc) è consigliato un trattamento post-chirurgico. Attualmente il trattamento più impiegato in questa condizione è la radioterapia. Alcuni elementi della storia naturale della malattia suggeriscono una possibile utilità della chemioterapia, ma non vi sono ancora studi clinici controllati a sostegno di tale indicazione. In letteratura sono state riportate piccole serie di pazienti che hanno ricevuto una radioterapia esterna pelvica e para-aortica per carcinoma endometriale con impegno linfonodale para-aortico.

Nella studio di Feuer e Calanog la sopravvivenza a 5 anni dopo radioterapia a campo esteso era 66,7% nelle pazienti con metastasi aortiche microscopiche e 16,7% in quelle con metastasi aortiche macroscopiche. Rose et al. hanno sottoposto a radioterapia para-aortica 17 delle 26 pazienti con metastasi linfonodali in questa area, ed hanno osservato che il 53% di esse erano viventi e libere da malattia dopo un intervallo mediano di 27 mesi. La sopravvivenza delle pazienti non sottoposte a questa terapia radiante e trattate con ormonoterapia o chemioterapia era significativamente peggiore ($p = 0,004$). La radioterapia para-aortica si associa tuttavia ad una non trascurabile incidenza di gravi complicanze intestinali. Hicks et al. (1993), analizzando 19 pazienti con impegno linfonodale para-aortico, hanno riscontrato che la sopravvivenza libera da malattia a 5 anni era 27% nelle pazienti trattate con radioterapia pelvica e para-aortica e 0% in quelle trattate con radioterapia pelvica ed ormonoterapia. Una positività dei linfonodi pelvici o para-aortici è stata trovata in 23 delle 856 donne incluse in uno studio multicentrico italiano sul trattamento del carcinoma endometriale in I stadio clinico. Queste pazienti hanno ricevuto una radioterapia pelvica e para-aortica, associata o meno ad ormonoterapia con medrossiprogesterone acetato 200 mg/die per os per 1 anno. Complessivamente 6 (26,1%) pazienti hanno sviluppato una recidiva, che era a distanza in 3 casi, regionale in 2 casi e pelvica in 1 caso. L'irradiazione dell'area para-aortica può essere efficace soprattutto nel controllo della malattia microscopica, anche dopo debulking chirurgico. Questo trattamento radiante è comunque poco utilizzato nella pratica clinica sia per il rischio di gravi sequele iatrogene sia perché l'eventuale interessamento dei linfonodi para-aortici è ritenuto sinonimo di diffusione sistemica di malattia.

I tumori con estensione alla vescica o al retto, così come i tumori con metastasi a distanza, alla diagnosi (stadi IVa e IVb) hanno una prognosi molto sfavorevole e sono trattati con un'indicazione personalizzata.

**Pazienti per le quali non è raccomandato alcun trattamento adiuvante**

| **Età** | > 75 anni | < 75 anni | < 75 anni |
|---|---|---|---|
| **Patologia concomitante** | presente | indifferente | indifferente |
| **Grading** | 1 | < 3 | < 3 |
| **Infiltrazione miometriale** | 1 | 1 | 1 |
| **Istologia** | endometrioide | endometrioide | speciali |
| **Linfonodi** | indifferente | N-Nx | N-N |

**Pazienti che possono beneficiare di un trattamento radioterapico adiuvante**

| **Età** | ≥ 75 anni | ≥ 75 anni | ≥ 75 anni | < 75 anni | < 75 anni | < 75 anni |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Patologia concomitante** | presente | assente | assente | indifferente | indifferente | indifferente |
| **Grading** | 2-3 | indifferente | indifferente | indifferente | indifferente | 3 |
| **Infiltrazione miometriale** | 2 | indifferente | 2 | indifferente | 2 | 1 |
| **Istologia** | indifferente | indifferente | indifferente | indifferente | indifferente | indifferente |
| **Linfonodi** | N+ | N+ | N-Nx | N+ | N-Nx | N-I |

**Pazienti che possono beneficiare di un trattamento chemioterapico adiuvante**

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Età** | ≥ 75 anni | ≥ 75 anni | < 75 anni | < 75 anni | < 75 anni |
| **Patologia concomitante** | presente | assente | indifferente | indifferente | indifferente |
| **Grading** | 2-3 | indifferente | indifferente | indifferente | 3 |
| **Infiltrazione miometriale** | 2 | indifferente | indifferente | 2 | 1 |
| **Istologia** | speciali | speciali | speciali | speciali | speciali |
| **Linfonodi** | N+ | N+ | N+ | N-Nx | N-N |

## Riprese di malattia e controllo periodico dopo trattamento

Le recidive vengono distinte rispetto alla sede in:

- recidiva vaginale isolata (cupola o parete);
- recidiva pelvica centrale;
- recidiva pelvica regionale (pareti e/o linfonodi);
- recidiva a distanza.

Le recidive vaginali isolate sono di due tipi:

- sulla cupola vaginale, dovuta ad una diffusione neoplastica intraoperatoria;
- sul terzo inferiore della vagina, dovuta ad una disseminazione vascolare più spesso linfatica che ematica.

La prima si verifica in genere entro 6 mesi, la seconda entro i 2 anni dalla prima terapia. Le riprese a distanza più frequenti sono quelle polmonari, epatiche ed ossee. Il 75% delle recidive compare entro 2 anni. Le pazienti dovrebbero pertanto essere seguite con uno stretto follow-up con esame pelvico, colpocitologia, vaginoscopia e visita generale. La vaginoscopia con test di Schiller e la colpocitologia permettono di diagnosticare precocemente una recidiva superficiale vaginale, facilitandone la cura. Dopo il secondo anno le pazienti vanno seguite ogni 6 mesi alla ricerca delle metastasi più frequenti. Accertamenti specifici di diagnostica per immagini (TC, RM) dovranno essere eseguiti per quesiti clinici specifici ed in riferimento alla classe di rischio della paziente e al trattamento effettuato.

Va ricordato che sono possibili riprese di malattia anche dopo un lungo intervallo dal trattamento primario. Il follow-up di queste pazienti deve pertanto essere continuato, con cadenza annuale, anche dopo il quinto anno.

## Trattamento delle riprese di malattia

Le recidive superficiali sulla cupola vaginale possono essere risolte con la sola brachiradioterapia. Il trattamento delle recidive pelviche, centrali e regionali va personalizzato in base alle loro dimensioni, al tempo di comparsa e al trattamento precedente. Una recidiva pelvica centrale o laterale, se di piccole dimensioni ed in pazienti non pre-trattate con radioterapia esterna, può essere affrontata con la radioterapia esterna. I trattamenti di elezione delle riprese a distanza sono la chemioterapia e la terapia ormonale. La chemioterapia si avvale del platino e dei suoi derivati, e delle antracicline, con risposte intorno al 20-25%. La terapia ormonale si avvale dei progestinici a dosi medio alte (160-1.000 mg die) a seconda dei farmaci

usati. Si può prendere in considerazione un approccio chirurgico in caso di metastasi viscerali isolati

## Prognosi

La prognosi per una paziente con neoplasia limitata al corpo dell'utero (stadio I) varia dal 70 al 95% di sopravvivenza a cinque anni, in funzione del grado istologico e dell'infiltrazione miometriale, essendo migliore per le neoplasie ben differenziate con minima o assente infiltrazione miometriale, e peggiore per quelle con questi elementi prognostici di segno sfavorevole. Anche le pazienti con una neoplasia a diffusione cervicale, quando trattate con una terapia chirurgica adeguata ed una terapia adiuvante se necessario, hanno una buona sopravvivenza a cinque anni (70-80%). Le neoplasie al terzo stadio dimostrano una prognosi diversa in rapporto alla sede della diffusione extrauterina (30-60%); in tale ambito la prognosi è migliore in caso di sola citologia peritoneale positiva (fino all'80%) ed inferiore per neoplasie con ampia diffusione pelvica e linfonodale e/o metastasi ovariche. La prognosi delle pazienti con neoplasia al quarto stadio è di solito pessima (0-15%) in rapporto alla presenza o meno di localizzazioni secondarie extrapelviche e alle condizioni generali (performance status) che possono condizionare le scelte terapeutiche personalizzate.

# MARCATORI TUMORALI

I marcatori tumorali sono sostanze prodotte direttamente dal tumore, come ormoni, enzimi o altre proteine, più o meno correlate con la crescita numerica delle cellule tumorali oppure sono sostanze prodotte dall'organismo in risposta al tumore, come le proteine della fase acuta dell'infiammazione.

Il marcatore è un segnale di neoplasia o di evoluzione di neoplasia in assenza di segni clinici, capace di indirizzare in modo più preciso una diagnosi iniziale o una diagnosi di ripresa di malattia. I marcatori tumorali che sono entrati nella routine clinica sono i marcatori tumorali circolanti in quanto sono facilmente accessibili con un semplice prelievo di sangue, si possono ripetere nel tempo e sono dosabili in ogni laboratorio.

## Caratteristiche del marcatore tumorale

Le caratteristiche che il marcatore tumorale deve avere dipendono dall'informazione che il clinico oncologo vuole avere da questo esame. Nella diagnosi precoce di neoplasia o addirittura nella identificazione di soggetti a rischio di ammalare di tumore (screening) il marcatore deve essere a)sensibile, cioè deve essere presente in tutti i pazienti con una determinata neoplasia, e b) specifico, cioè deve essere una caratteristica peculiare del tumore e deve essere assente in tutti i soggetti non neoplastici. Un marcatore tumorale ideale per essere usato nello screening dovrebbe avere una sensibilità e specificità del 100% per evitare dei valori falsamente negativi (marcatore tumorale negativo in soggetto neoplastico) o dei valori falsamente positivi (marcatore tumorale positivo in soggetto con patologia benigna). Elevata sensibilità e specificità sono necessarie anche quando il marcatore tumorale è richiesto per

identificazione precoce di ripresa di malattia. Se il marcatore è dosato per monitorare la terapia è necessario che sia correlato alla massa tumorale affinchè le variazioni della concentrazione del marcatore riflettano quelle del tumore.

## La realtà del marcatore tumorale

La ricerca insegue sempre lo "specifico" del tumore, una caratteristica cioè che il tumore abbia in più, e non di meno, rispetto al normale e sulla quale fare leva per colpire la cellula tumorale. Purtroppo la cellula tumorale sa mimetizzarsi molto bene e presenta caratteristiche molto simili alla cellula normale, nonostante il suo comportamento così poco normale. Nessuno dei marcatori tumorali che oggi si conoscono è una prerogativa specifica del tumore in quanto sono tutte sostanze presenti anche in altre condizioni, non esclusa la normalità. Al momento nessun marcatore tumorale ha caratteristiche di sensibilità e specificità tali da essere usato nella diagnosi precoce e/o screening di massa di una neoplasia. Invece, in associazione ad altre indagini strumentali, i marcatori tumorali possono aiutare il clinico nella diagnosi differenziale tra patologia benigna e maligna. La fase nella quale i marcatori tumorali trovano migliore applicazione è l'identificazione precoce di recidive o metastasi nel paziente neoplastico libero da malattia. Infatti, il problema del valore soglia è superato in questo caso dal fatto che si stabilisce un valore soglia fisiologico per ogni paziente, costruito sull'andamento del marcatore durante il controllo. Un innalzamento del valore è fortemente significativo di ripresa di malattia, purché il valore del marcatore sia confermato da altri due o tre dosaggi successivi e sia stata esclusa qualunque patologia benigna concomitante. Purtroppo non è vero il contrario, cioè non sempre un valore negativo di marcatore esclude la presenza di malattia.

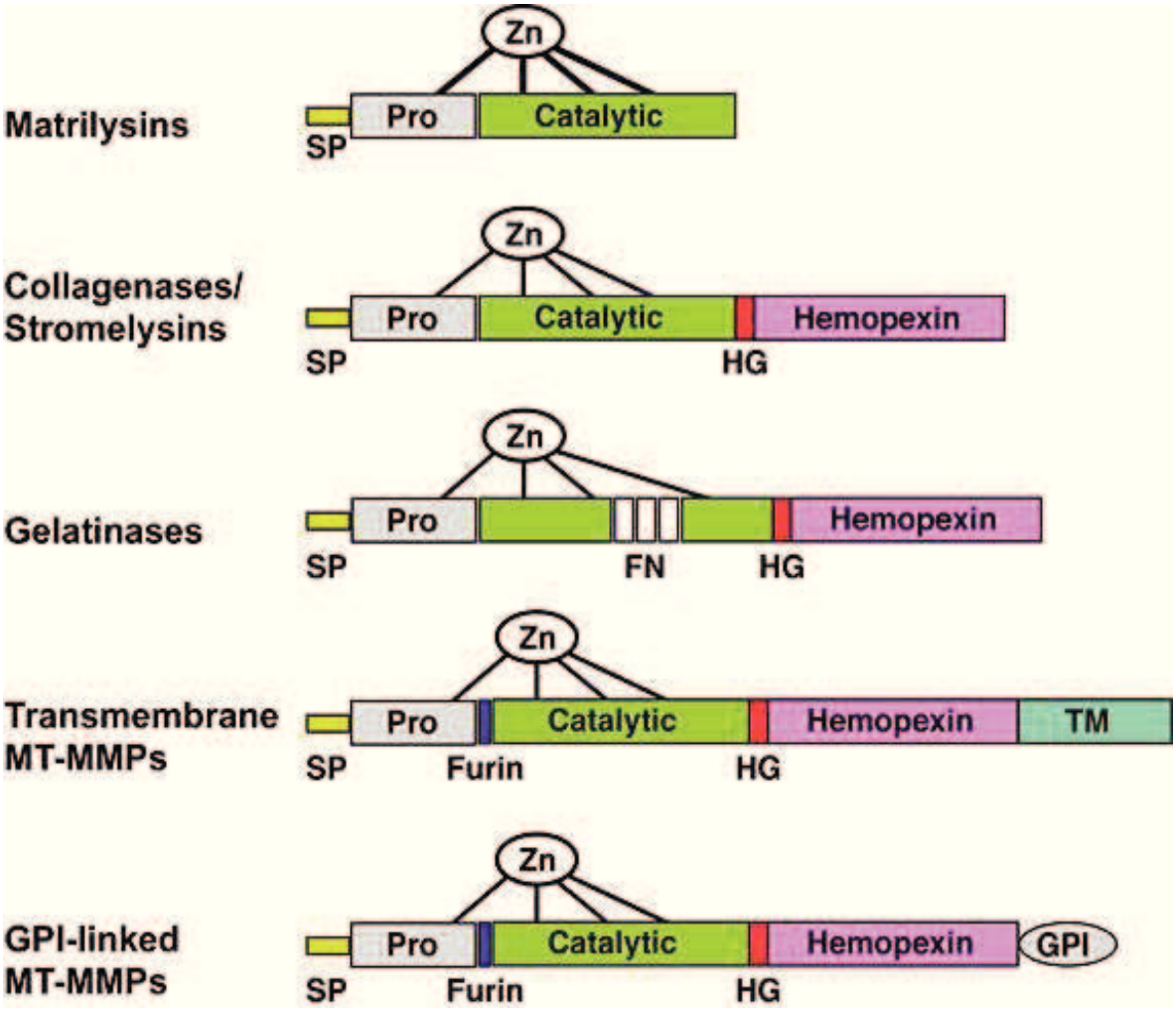
# LE METALLOPROTEASI

Il rimodellamento tissutale è un complesso processo multifasico frequentemente implicato sia in stati fisiologici che patologici legati ai meccanismi propri della guarigione delle ferite, dello sviluppo fetale, dei processi responsabili dell'infiammazione delle articolazioni, dell'invasione tumorale e delle metastasi. I principali gruppi di enzimi degradanti la matrice extracellulare sono le metalloproteasi (MMP), suddivise in sottogruppi a seconda delle caratteristiche biochimiche del loro sito attivo. Le metalloproteasi di matrice (MMP) sono una famiglia di enzimi prevalentemente prodotti da cellule del tessuto connettivo, secreti come zimogeni nella matrice extracellulare. Le MMP sono endopeptidasi multi dominio, zinco e calcio dipendenti, che operano una specifica attività proteolitica su gran parte dei costituenti della matrice extracellulare (Nagase H, 2006). Fino ad oggi sono state descritte almeno 19 MMP, implicate in numerosi processi fisiologici tra i quali la riproduzione, lo sviluppo fetale e la guarigione delle ferite, e in altrettanti processi patologici tra cui l'invasione di cellule tumorali e metastasi, la degradazione tissutale propria dei processi infiammatori di vari organi, l'endometriosi (Shaco-Levy R, 2008), alcune patologie polmonari, la sclerosi multipla, l'aterosclerosi e alcune patologie della cute. E' soprattutto nel campo dell'oncologia che negli ultimi dieci anni si è concentrata l'attenzione di ricercatori di tutto il mondo per stabilire il rapporto esistente tra cancro e metalloproteasi. Così si è trovata una certa correlazione per il tumore dello stomaco (Tang Y, 2008 - Dragutinović V, 2009), del polmone ( Hu Z, 2005 - Hoikkala S, 2005), seno (Somiari SB, 2006 (a,b) - Chabottaux V, 2007 - Hojilla CV, 2008), colon-retto (Dragutinović VV, 2011), testa e collo (Ruokolainen H, 2005 – Dunne AA, 2005),

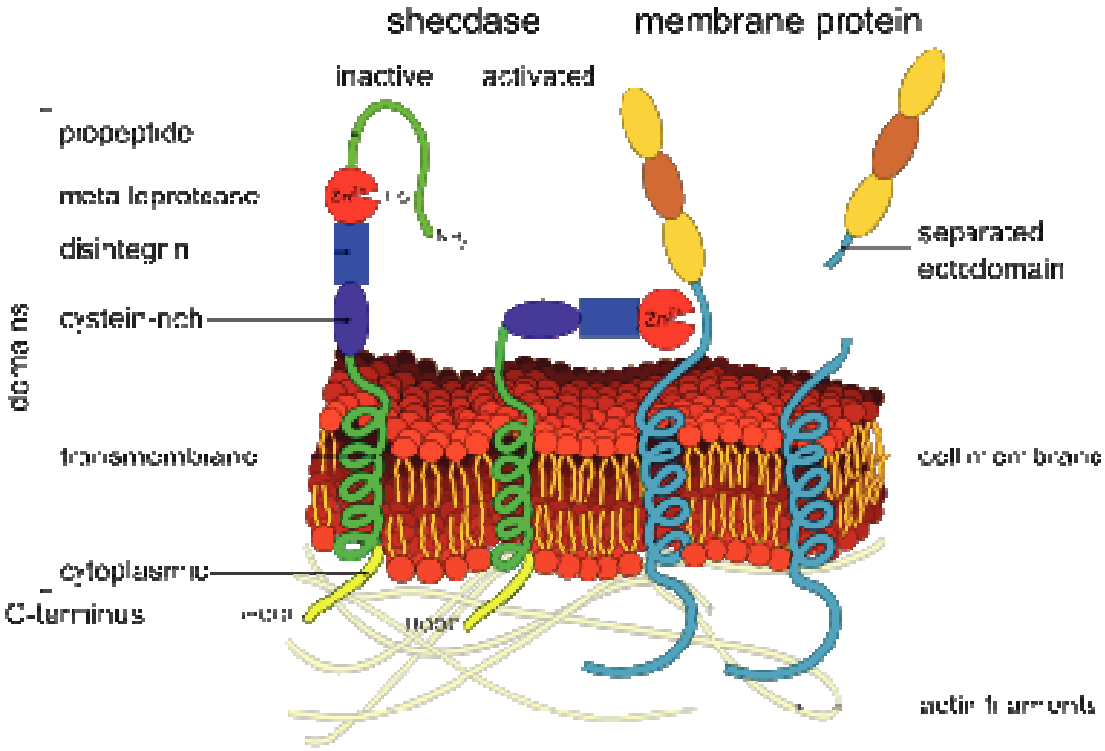
prostata (Castellano G, 2008), pancreas (Nakamura T, 2007), melanoma (Cotignola J, 2007), neuroblastoma (Chantrain CF, 2004) e per tutti i tumori del tratto genitale femminile ( Di Nezza LA, 2002 - Piura B, 2003 - Rauvala M, 2006 - Talvensaari-Mattila, 2006 - Yang SF, 2007 - Wang PH, 2008 - Fernandes T, 2008 - Libra M, 2009 - Brooks R, 2010). I prodotti di degradazione delle proteine di matrice partecipano alla regolazione del comportamento cellulare, svolgendo un ruolo chiave nel regolare la degradazione della matrice extracellulare, e le MMP risultano, come già ricordato, coinvolte in numerosi processi di rimodellamento tissutale associati alla crescita ed allo sviluppo e in varie patologie.

In base all'efficienza di proteolisi dei componenti della matrice ed alla composizione in domini la famiglia viene suddivisa in quattro classi principali: **gelatinasi** (MMP-2, MMP-9), **collagenasi** (MMP-1, MMP-8, MMP-13), **stromelisine** (MMP-3, MMP-10, MMP-12), **metalloproteasi di membrana** (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP).

Dal punto di vista strutturale ogni membro della famiglia è costituito da un propeptide amino terminale, un dominio catalitico (che presenta almeno 2 ioni calcio e 2 ioni zinco) e un dominio C-terminale strutturalmente simile all'emopexina, che è probabilmente responsabile della specificità per il riconoscimento del substrato ed è presente nella stragrande maggioranza delle MMP ad eccezione della matrilisina che è quindi la più piccola delle MMP conosciute.



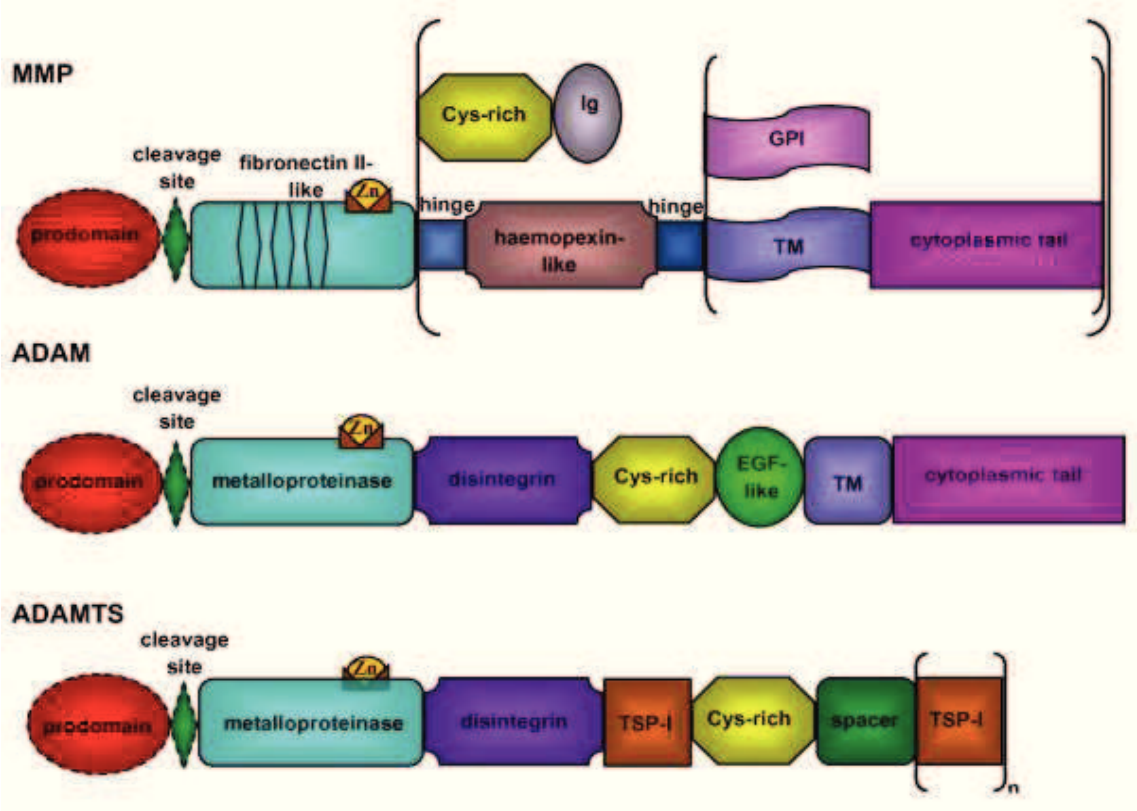

*Struttura e classificazione delle Metalloproteasi.*



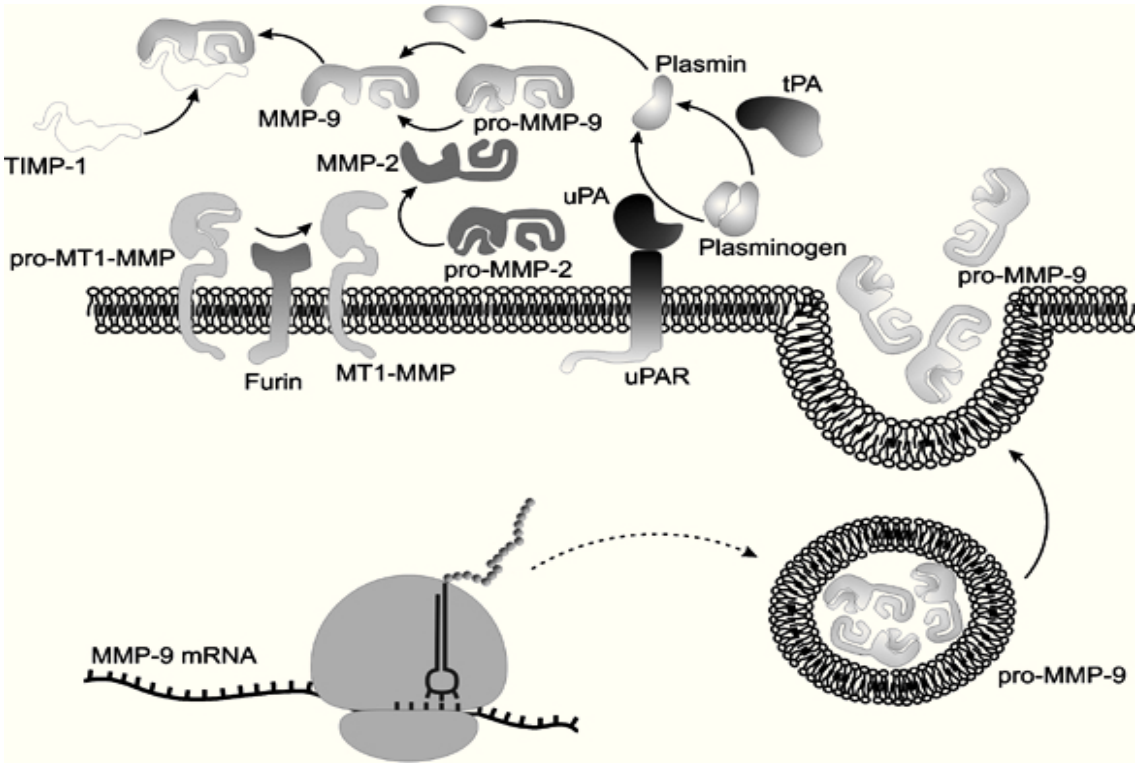

*Struttura  delle Metalloproteasi di membrana.*

Nel tessuto normale, degradazione e sintesi dei componenti della matrice extracellulare devono necessariamente essere in un mutuo equilibrio. Un moderato livello di espressione di alcune MMP con attività enzimatica strettamente controllata è un processo necessario per il mantenimento della condizione di equilibrio, anche in risposta a stimoli endogeni od esogeni sia fisiologici che patologici. Citochine infiammatorie, ormoni, fattori di crescita e interazioni cellula-cellula e cellula-matrice modulano l'espressione di queste molecole attraverso cambiamenti nei livelli di trascrizione (Oh JH, 2009). Inoltre la loro attività è regolata da attivatori locali, come la plasmina, e da specifici inibitori tissutali delle MMP, i cosiddetti inibitori tissutali delle MMP (**TIMP**) (Piura B, 2003 - Feng-qiang Wang, 2010).

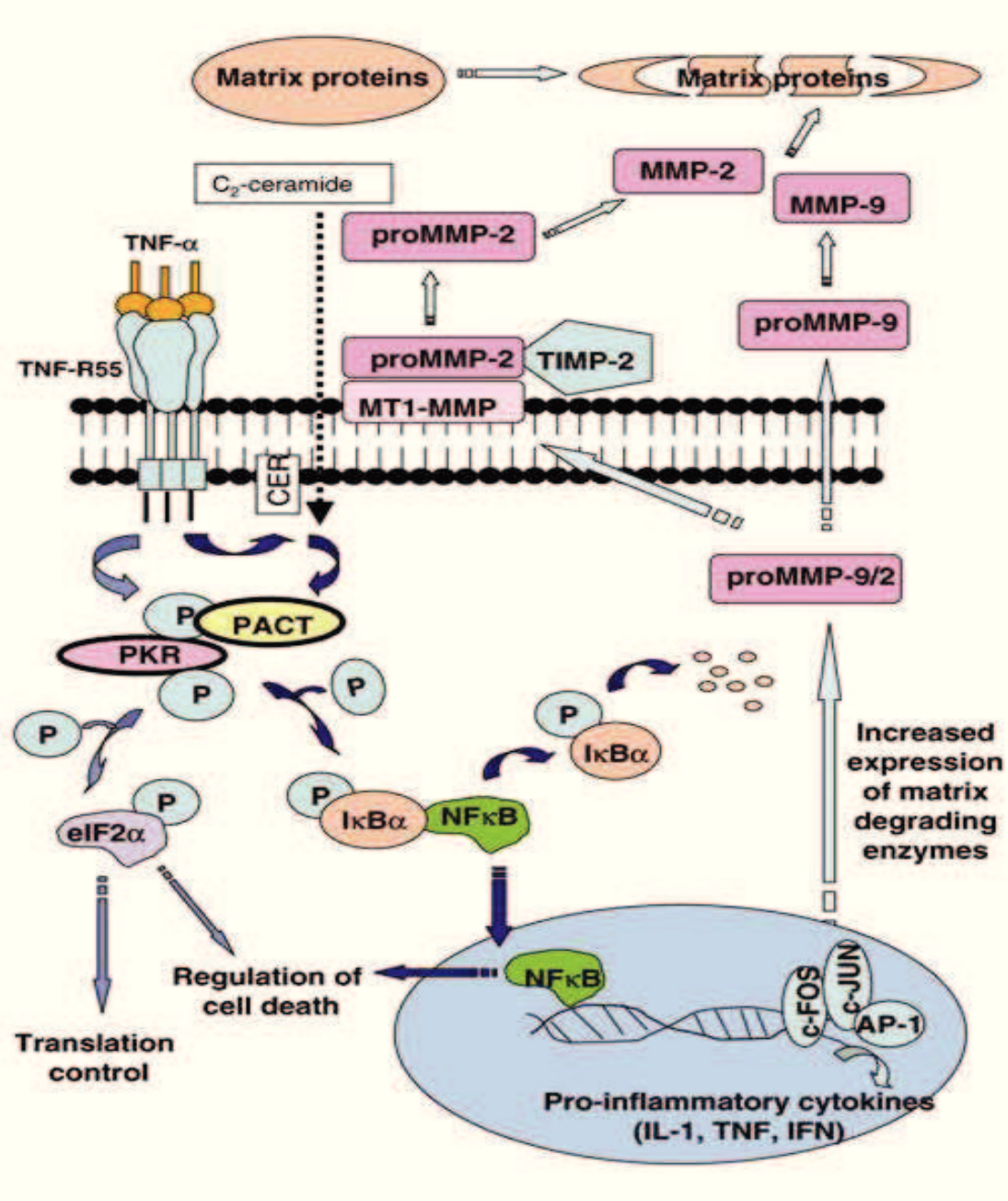
Gran parte delle MMP sono secrete sotto forma di un precursore inattivo che tramite attivazione proteolitica all'esterno della cellula si trasforma in MMP attiva ad eccezione della stromolisina-3 e della MT1-MMP che vengono attivate all'interno della cellula. L'attivazione delle MMP dipende, ed è regolata, da un complesso meccanismo chiamato "cystein-switch". Esso è caratterizzato dall'interazione di una cisteina altamente conservata nel propeptide con lo zinco in un sito catalitico che blocca l'accesso del substrato allo stesso. Molto verosimilmente, in vivo l'attivazione avviene mediante processi proteolitici in cui enzimi come tripsina, plasmina e callicreina trasformano il proenzima in una forma intermedia attiva che poi autocataliticamente taglia se stesso, trasformandosi nella forma permanentemente attiva. Alcune MMP del sottogruppo delle streptolisine sono capaci di "superattivare" altre MMP direttamente nella forma totalmente attiva.



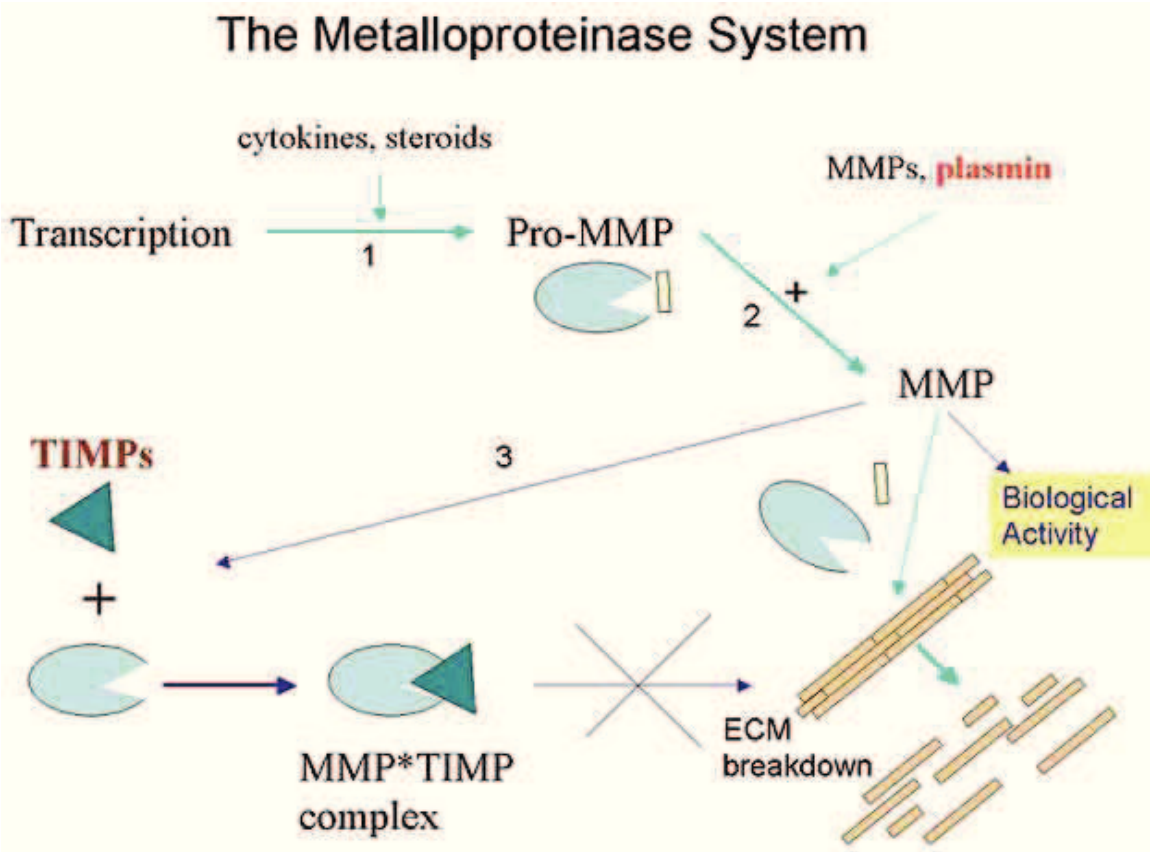

*Struttura delle Metalloproteasi nella quale è evidente il sito ricco in cisteina che regola il meccanismo di attivazione chiamato "cystein-switch".*



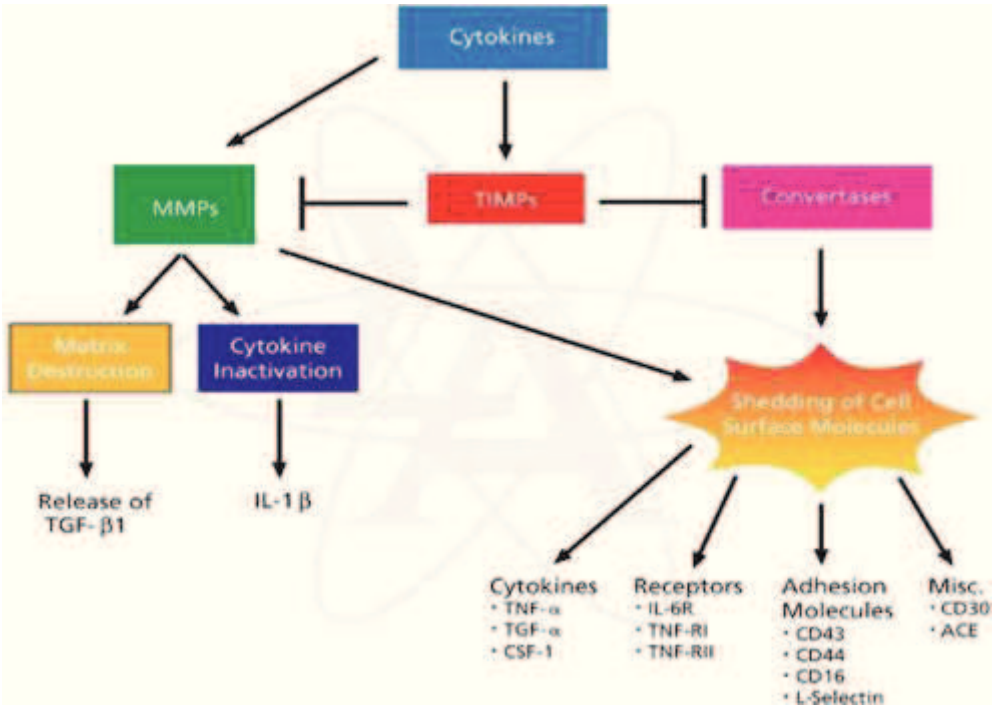

*Raffigurazione dell'attivazione dei proenzimi di Metalloproteasi da parte del sistema Plasminogeno-Plasmina.*




*Raffigurazione dell'attivazione dei proenzimi di Metalloproteasi da parte di citochine pro-infiammatorie..*




*Sintesi del sistema di attivazione e inibizione delle Metalloproteasi.*

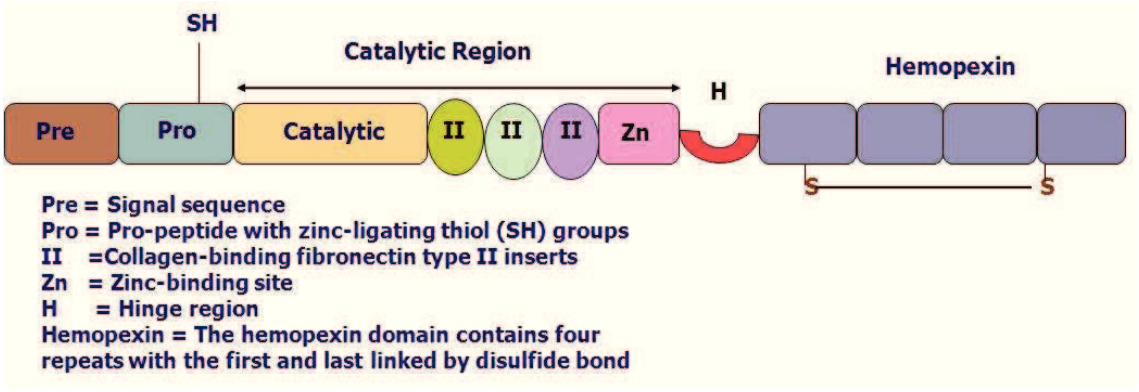



*Sintesi del sistema di attivazione e inibizione delle Metalloproteasi.*

# METALLOPROTEASI-9

## Struttura

La Metalloproteasi di matrice MMP-9, noto anche come gelatinasi B collagenasi di tipo IV, è il principale componente strutturale della membrana basale, sintetizzata e secreta in forma monomerica come zimogeno. Situata nello spazio sia peri- che extracellulare. La struttura è quasi simile a MMP-2, un altro membro della famiglia delle metallo proteinasi di matrice. Il gene di MMP-9 si trova allocato nel cromosoma 20q11.2-q13.1. Polimorfismi del promotore di MMP-9 sono stati implicati nella regolazione dell'espressione genica e della suscettibilità a varie malattie. MMP-9 è rilasciata dalle cellule come un pro-enzima latente di 92 kDa che viene scisso da proteasi esogene per generare la forma attiva di 84 kDa. La forma nascente della proteina presenta una sequenza segnale N-terminale (dominio "pre") che indirizza la proteina verso il reticolo endoplasmatico. Il dominio pre- è seguito da un propeptide dominio "pro" che mantiene la latenza enzimatica fino a quando non viene clivato o distrutto, e un dominio catalitico che contiene la regione conservata zinco-vincolante. Come gli altri enzimi proteolitici, MMP-9 è sintetizzato come proenzima inattivo o zimogeno. L'attivazione di proMMP-9 è mediata dal sistema attivatore del plasminogeno / plasmina (PA / plasmina).




*Struttura di base del dominio delle gelatinasi (El Houda Agueznay N,2007).*

MMP-9 viene espressa in quantità considerevoli soltanto in concomitanza di processi patologici, primi fra tutti i tumori. In particolare un gruppo di ricercatori ha studiato 96 soggetti con cancro alla prostata e 92 con iperplasia prostatica ed ha concluso che i livelli plasmatici di MMP-9 erano considerevolmente più elevati che in soggetti sani (Castellano G, 2008).

Fisiologicamente ci sono solo pochi tipi di cellule che esprimono MMP-9 tra cui trofoblasti, gli osteoclasti, leucociti, cellule dendritiche e loro precursori, e, a tale riguardo, MMP-9 è diverso da MMP-2, che si esprime in una grande varietà di tipi cellulari anche in condizioni normali (Roomi MW, 2008).

In uno studio che valuta l'espressione di MMP2 e MMP9 nell'endometrio proliferativo, nell'endometriosi e nel carcinoma endometrioide, si conclude che l'endometrio normale proliferativo esprime grande quantità di MMP2 ed è completamente negativo per MMP9, il tessuto endometriosico esprime elevati livelli sia di MMP2 che di MMP9,

mentre entrambe le metalloproteasi non sono spiccatamente presenti nel carcinoma endometrioideo dell'endometrio (Ruthy Shaco-Levy, 2008).

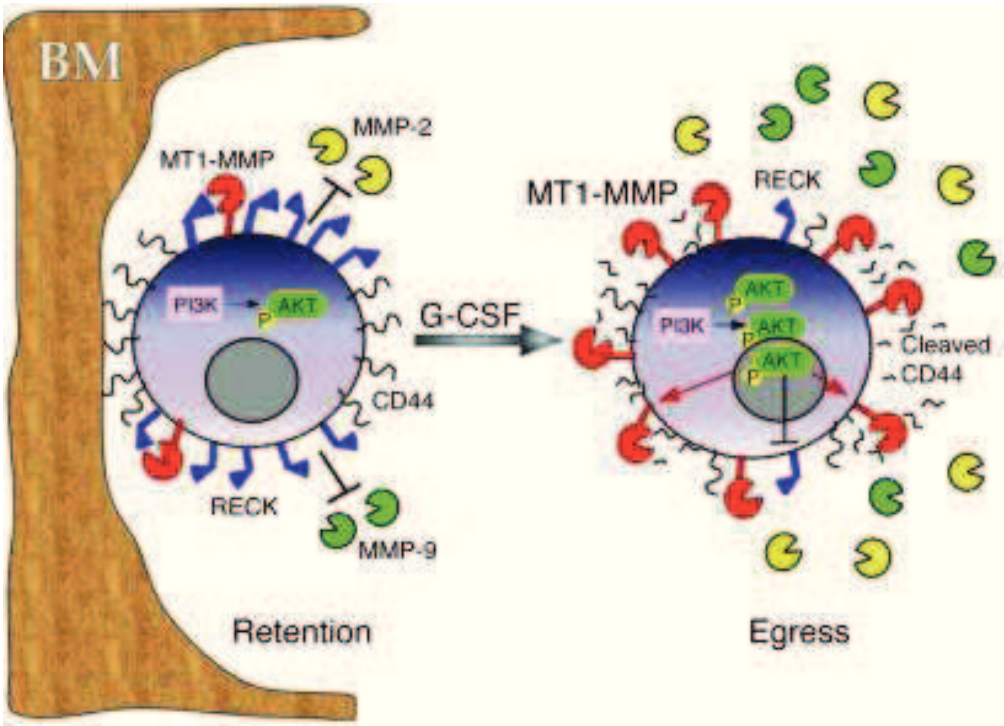
L'espressione di MMP-9 è regolata da diverse citochine e fattori di crescita, tra cui le interleuchine, interferoni, EGF (*Epidermal Growth Factor*), NGF (*Nerve Growth Factor*), FGF basica (*Fibroblast Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), PDGF (*Platlet Derived Growth Factor*), TNF-α (*Tumor Necrosis Factor-α*) (Lee SO, 2006), TGF-β (*Tranforming growth factor-β*), l'induttore delle metalloproteinasi della matrice extracellulare EMMPRIN e anche Osteopontina. Molti di questi stimoli inducono l'espressione e/o l'attivazione dei prodotti dei proto-oncogeni *c-fos* e *c-jun*, che eterodimerizzano e si legano alla proteina attivatrice-1 (AP-1) situata all'interno dei promotori del gene MMP-9 ()(Sternlicht MD, 2001 - El Houda Agueznay N, 2007 - Bhoopathi, 2008 - Lee SO, 2008- Chaudhary AK, 2010).

## Funzioni fisiologiche

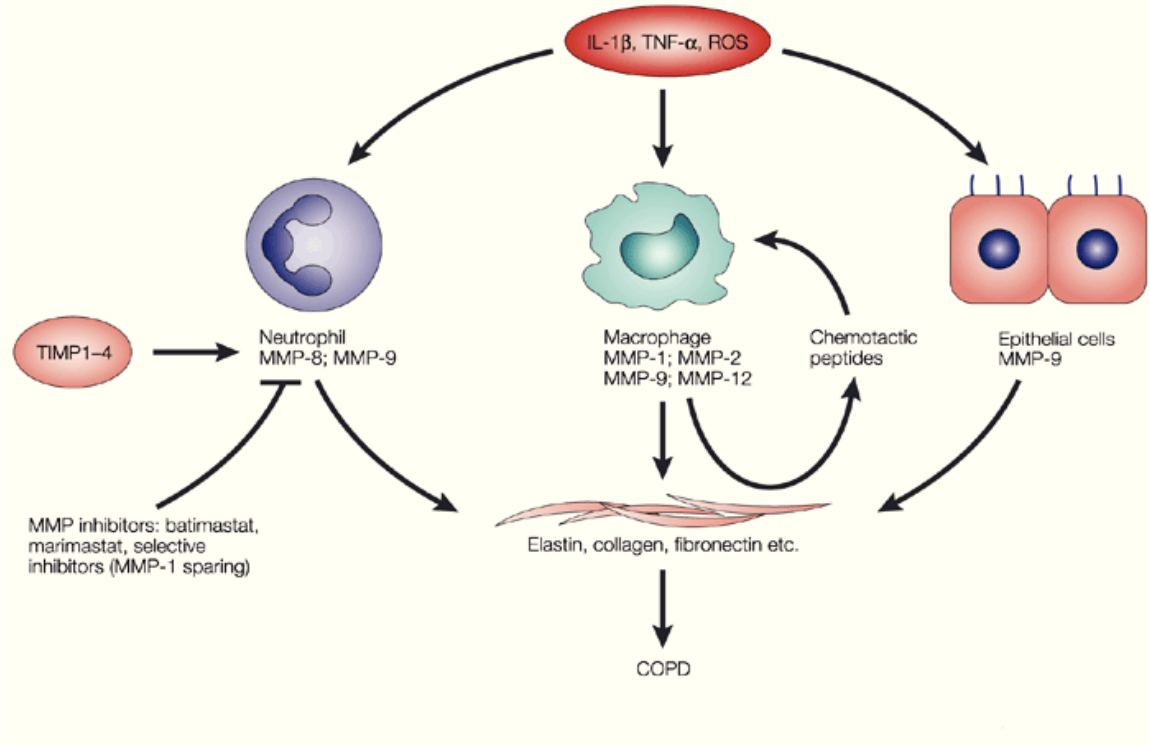
Le proteine della famiglia delle metalloproteinasi della matrice (MMP) sono coinvolte nella degradazione della matrice extracellulare in condizioni fisiologiche quali lo sviluppo embrionale, la riproduzione e il rimodellamento tissutale. Nell'endometrio normale, l'espressione epiteliale di MMP2, MMP7 e TIMP2 aumenta durante la fase proliferativa del ciclo mestruale (Ruthy Shaco-Levy, 2008). Le cellule dello stroma endometriale della fase secretiva, mostrano alta espressione di MMP2 e una debole espressione di MMP7 e TIMP1 (Graesslin O, 2006 b). Le cellule NK dell'utero, per esempio, appaiono essere il maggiore regolatore materno della placentazione attraverso fattori di crescita, citochine e proteinasi. Le cellule della decidua gravidica umana, possiedono un'attività proteasica innata, specialmente rilasciando MMP2 che provvede

alla regolazione dell'invasione del trofoblasto e del rimodellamento delle arterie spirali nella fase iniziale della placentazione umana (Katsuhiko Naruse, 2009).

Le MMP sono considerate critiche nel facilitare la migrazione dei monociti e di altri leucociti attraverso la membrana basale.




*Stimolazione della crescita e migrazione leucocitaria*
*da parte delle Metalloproteasi attraverso fattori di crescita.*




*Meccanismo di autoamplificazione della crescita e migrazione leucocitaria da parte delle Metalloproteasi attraverso fattori di crescita.*

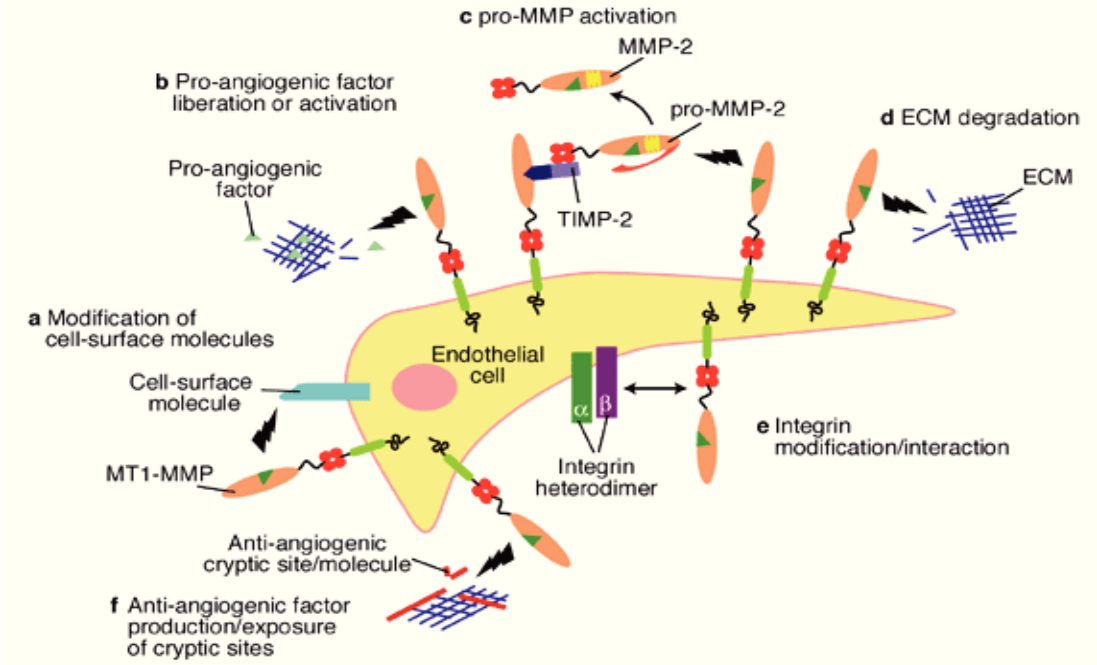
Studi sulla chemiotassi di eosinofili verso PAF o IL-5 e U937 verso TNFα o IL-1α attraverso matrigel inserti rivestiti ha anche mostrato la necessità di attività della MMP-9 per bloccare questo processo, poiché MMP-9 mediante anticorpi inibisce la migrazione (Bloopathi P, 2008 – Lee SO, 2006).

Fisiologicamente, MMP-9 in sinergia con le altre MMPs, svolge un ruolo nei normali eventi di rimodellamento tissutale come la crescita dei neuriti, lo sviluppo embrionale, l'angiogenesi, l'ovulazione, l'involuzione della ghiandola mammaria e la guarigione delle ferite. La MMP-9 con altre MMP è coinvolto anche nella formazione ossea

osteoblastica e / o inibisce il riassorbimento osseo, mediato dagli osteoclasti (Sternlicht MD, 2001).

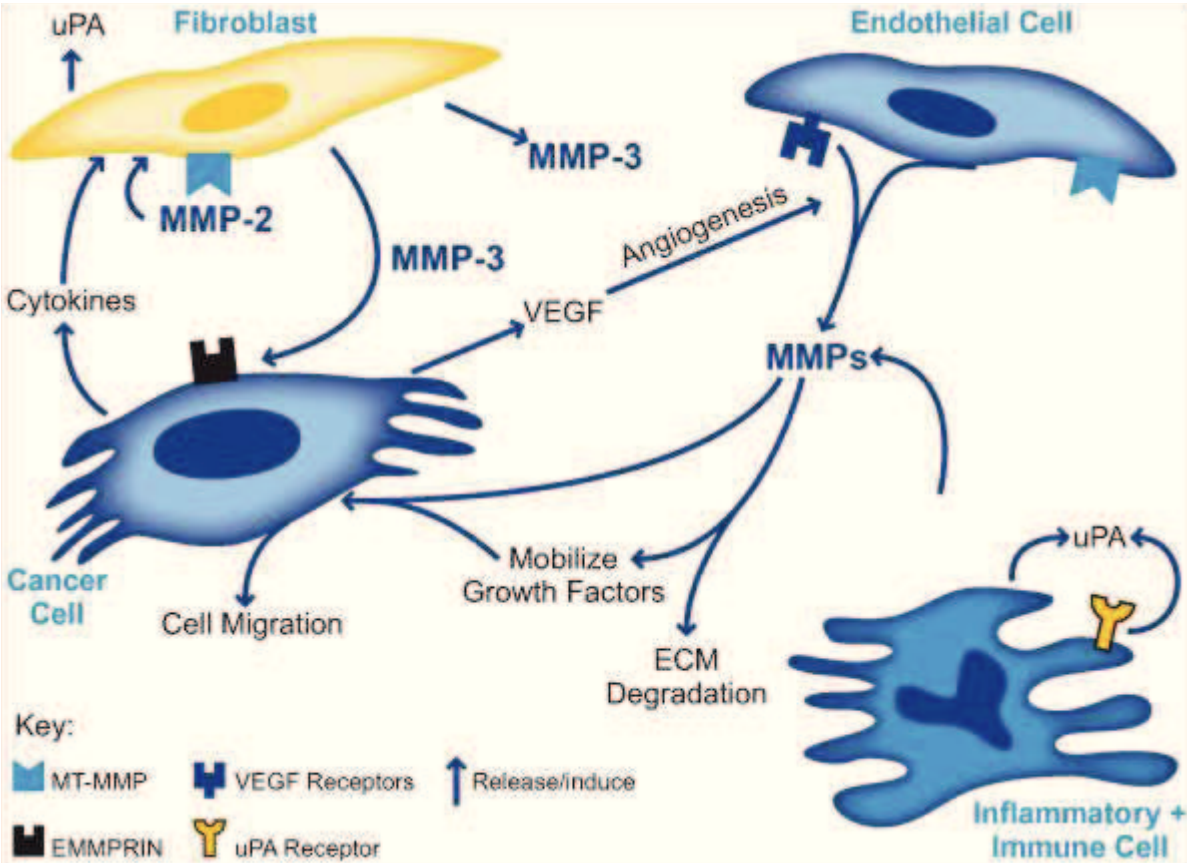
## Funzioni nella progressione tumorale

L'invasione tumorale è un processo *multistep* in cui la motilità cellulare risulta accoppiata alla proteolisi e coinvolge le interazioni delle cellule con l'ECM (matrice extracellulare). Durante l'invasione, le cellule maligne si staccano dal tumore primario e invadono attraverso le membrane basali l'ECM stromale (Piura B, 2003). Nonostante le osservazioni sull'espressione abbondante di MMP specifiche in tumori invasivi primari o nelle loro metastasi, le prove per l'attività di distinte MMP nei tessuti tumorali *in vivo* è limitato. Inoltre i risultati dei pochi studi che la letteratura mette a disposizione sono contraddittori. Nella maggior parte dei tumori maligni, i fibroblasti stromali sono la fonte primaria di MMPs. In molti tumori solidi, le cellule circostanti al tumore esprimono MMP maggiormente dello stesso tessuto tumorale ed il tessuto stromale comunica con le cellule tumorali e coopera alla progressione del tumore (Di Nezza, 2002). L'intensa comunicazione tra cellule tumorali ed il tessuto circostante, induce le cellule dello stroma a diventare cellule alterate (Roomi MW, 2008). L'infiltrazione di cellule infiammatorie è una caratteristica importante di molti tumori e le stesse cellule leucocitarie producono MMP anche nell'ambiente peri-tumorale. Le cellule infiammatorie producono inoltre citochine, che aumentano l'espressione di MMP da parte delle cellule tumorali e stromali.

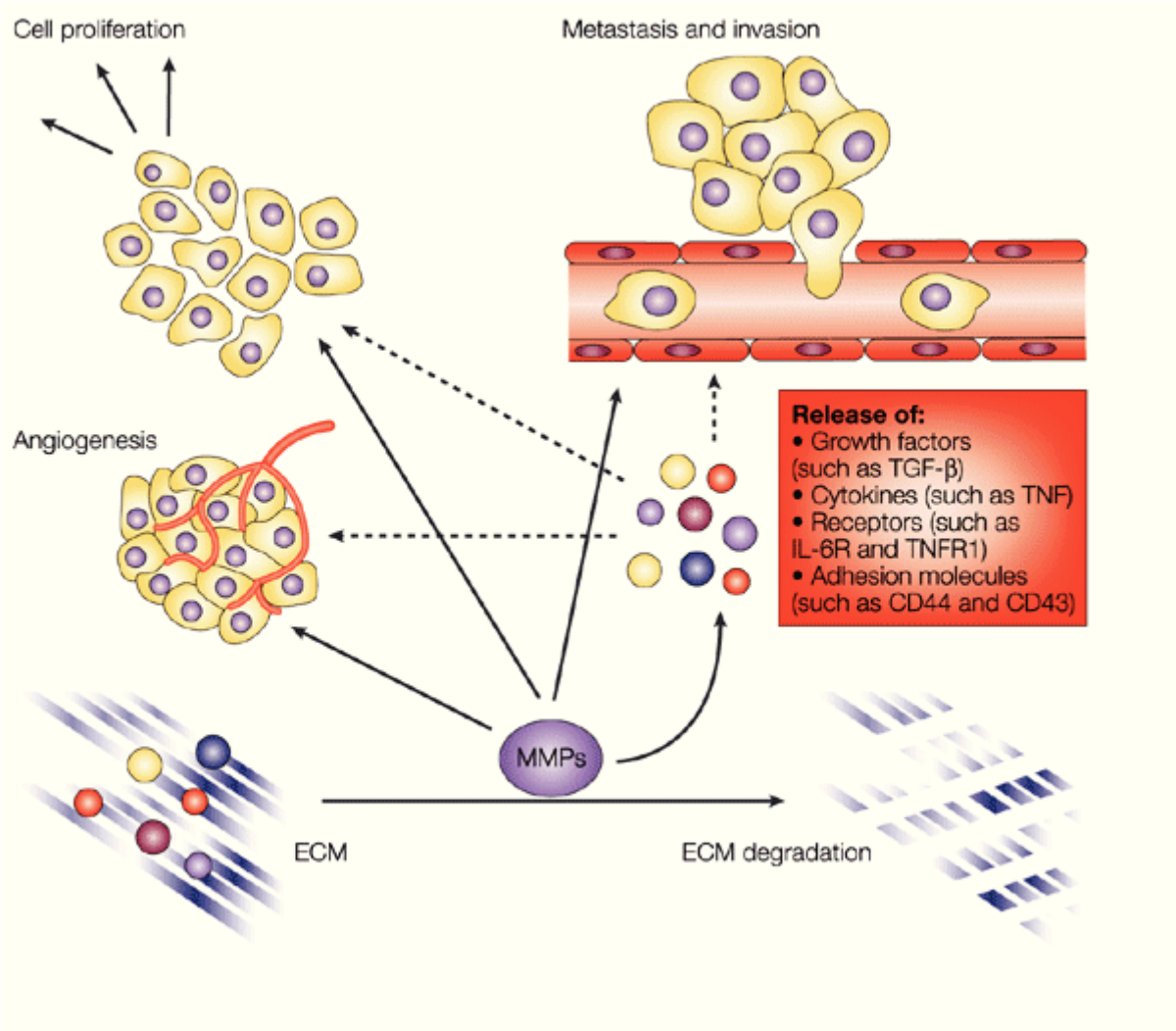



Potential and established roles for the matrix metalloproteinases (MMPs) during angiogenesis

Expert Reviews in Molecular Medicine©2003 Cambridge University Press




*Stimolazione della crescita e migrazione di cellule tumorali*
*e della neoangiogenesi da parte delle Metalloproteasi.*




*Ruolo stimolante delle Metalloproteasi sulla proliferazione, invasione metastatica di cellule tumorali e sulla neoangiogenesi.*

Uno studio condotto su tutti i tipi di tumori del tratto genitale femminile, ha evidenziato quanto segue: 1) nel carcinoma ovarico e della cervice la sovra-espressione di MMP2 e MMP9 è associata a maggiore invasività, diffusione metastatica e prognosi infausta; 2) nel carcinoma dell'endometrio MMP7 è la MMP principale associata ad invasività, diffusione metastatica e prognosi infausta; 3) nella neoplasia intraepiteliale cervicale (CIN) MMP2 è indicativa di progressione da CIN I a CIN II; 4) nel carcinoma a cellule squamose della vulva la sovra-espressione di MMP13 si associa ad invasività diffusione metastatica e prognosi infausta. Nello stesso studio si ipotizza che l'uso di farmaci sintetici che inibiscano le MMP in combinazione con la chemioterapia possa contribuire al miglioramento dei risultati del trattamento dei pazienti oncologici (Piura B, 2003). Cellule tumorali producono fattori che favoriscono la produzione di MMP da parte dei fibroblasti. MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP1 e TIMP-2 si esprimono nel citoplasma delle cellule del carcinoma dell'endometrio. MMP-2 si esprime nei fibroblasti e nelle cellule endoteliali del tumore. MMP-7 non è stata trovata nelle cellule stromali. MMP-9 è soprattutto immunolocalizzata nelle cellule infiammatorie dello stroma (Graesslin O, 2006 b).

Spunto al nostro lavoro sono stati i risultati di uno studio francese del 2006, il cui obiettivo era esaminare l'espressione di MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 nell'endometrio normale, iperplastico e maligno e i cui risultati sono stati i seguenti: nell'endometrio normale in qualunque fase del ciclo mestruale le cellule dell'epitelio endometriale risultano positive per MMP-7, -9, TIMP-1 e TIMP-2. MMP-9 e TIMP-2 non variano nelle diverse fasi del ciclo. Nell'endometrio iperplastico non è stata trovata nessuna differenza qualitativa immunoreattiva per MMP 2, MMP 7, MMP 9 e TIMP 1 e 2 nelle cellule dello stroma tra endometrio con atipie e senza atipie. Ma nelle cellule epiteliali la presenza di atipie è associata ad una bassa espressione di TIMP-2 e ad una

maggiore espressione di MMP-2. Nel carcinoma endometriale è stata osservata una maggiore espressione di MMP-2 rispetto all'iperplasia con atipie; inoltre l'aumento di MMP-2 e la diminuizione di TIMP-2 sono correlati al grado istologico. Mentre l'espressione di MMP-7 è più bassa nel carcinoma rispetto all'iperplasia con atipie. TIMP-2 è correlata all'invasione miometriale, al coinvolgimento dello spazio linfovascolare e dei linfonodi. In conclusione l'aumento di MMP.2 e la debole espressione di TIMP.2 sono i più potenti marcatori di malignità dell'endometrio ad alto rischio di diffusione locale e a distanza, suggerendo così il loro potenziale prognostico. (Graesslin O, 2006 a).

E' probabile che le MMP formino una rete in cui un singolo MMP scinde o degrada parzialmente i componenti della matrice e attiva altre MMP latenti. E' anche probabile che le MMP giochino un ruolo distinto in diverse fasi di sviluppo del tumore. I livelli di espressione alta di alcune MMP sono legati alla capacità di invasione del tumore in vivo (Di Nezza LA, 2002).

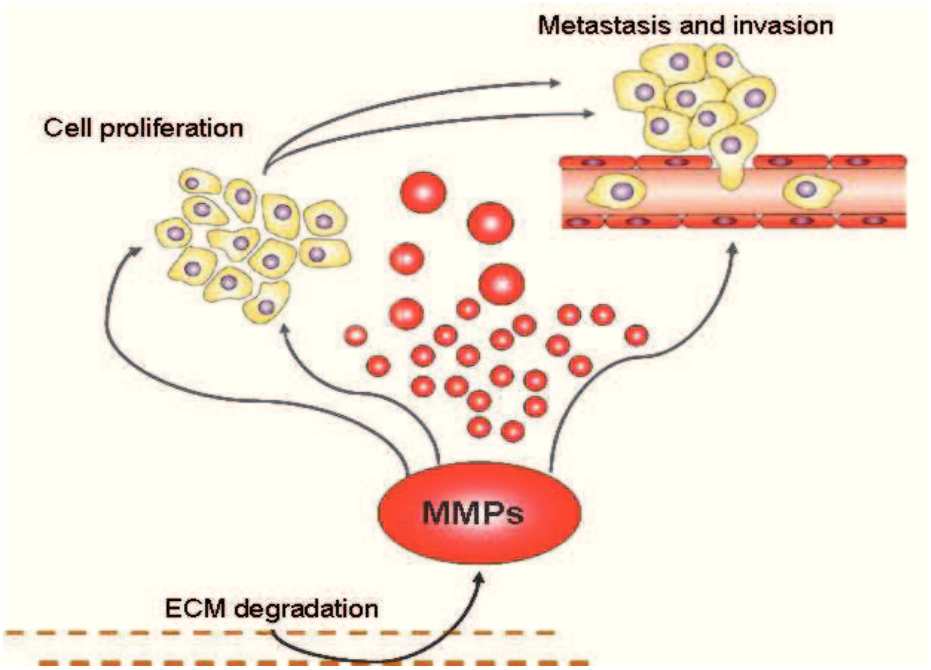
Elevati livelli di MMP-9 si manifestano generalmente in tumori altamente invasivi e metastatici, questo perché, le MMP promuovono la progressione del tumore e delle metastasi nei tumori invasivi attraverso la degradazione della ECM (matrice extracellulare), che consiste di due componenti principali: le membrane basali e il tessuto interstiziale connettivo. Anche se ECM comprende molte proteine (laminina-5, proteoglicani, entactina, osteonectina) il collagene IV è l'elemento principale.

MMP-2 e MMP-9 degradano in modo efficiente il collagene IV e laminina-5 in tal modo permettono alle cellule tumorali metastatiche di passare attraverso la membrana basale. La degradazione di ECM non aiuta solo la migrazione di cellule tumorali metastatiche, ma permette anche di migliorare la crescita del tumore, fornendo lo spazio necessario. Inoltre, è da notare che il rapporto tra forma attiva e latente di MMP-9 è

aumentata con la progressione del tumore nei cancri invasivi. MMP-9, in associazione ad altre MMP promuove l'angiogenesi (un processo critico necessario per la sopravvivenza delle cellule tumorali), degradando l'interstizio vascolare e la membrana basale e rilasciando inoltre il VEGF sequestrato, che è una nota molecola angiogenica. La localizzazione del MMP-9 sulla superficie delle cellule è richiesta per promuovere l'invasione tumorale e l'angiogenesi (John A, 2001 - Vihinen P, 2002). Questo è confermato da lavori che mostrano come la sovraespressione di MMP-9 è correlata con l'invasione vascolare e linfatica e la sua espressione, in associazione a quella di MMP-2 può essere associata a parametri di aggressività tumorale (Karahan N, 2007). I primi a dimostrare la correlazione tra espressione di MMP-2, rischio di recidire e sopravvivenza, furono un gruppo di ricercatori finlandesi, che videro come l'MMP-2 positiva correla con maggiore probabilità di recidive e minore sopravvivenza, suggerendo così l'associazione esistente tra natura biologicamente aggressiva di questo tumore e positività per MMP-2. Inoltre sempre nello stesso lavoro, non si è trovata associazione significativa tra l'immunoreazione positiva per MMP-9, MMP-2 e l'età, lo stadio clinico, il grado istologico, la profondità d'invasione o la citologia peritoneale (Honkavuori M, 2007). Prima di loro, Moser et al. nel 1999 e Oglund et al. nel 2004, non avevano invece trovato alcuna correlazione significativa tra MMP-2 e sopravvivenza. L'anno successivo in Polonia, un gruppo di studio ha analizzato l'attività delle metalloproteasi MMP-2 e MMP-9 e dei loro inibitori TIMP-1 e TIMP-2 nel carcinoma dell'endometrio e nell'endometrio normale. Dai risultati emerge che l'attività media e la frazione attivata di MMP-9 è significativamente aumentata nel carcinoma endometriale rispetto all'endometrio normale; ciò non è emerso per MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2, suggerendo che solo MMP-9 potrebbe avere un ruolo importante

nella progressione del carcinoma endometriale anche per deficit relativo di TIMP-1 (Bogusiewicz M, 2007 – Oh JH, 2009).

Dati discordanti si evincono da uno studio che valuta l'espressione di MMP-2 e MMP-9 nell'endometrio proliferativo, nell'endometriosi e nel carcinoma endometrioideo, in cui si conclude che l'endometrio normale proliferativo esprime grande quantità di MMP-2 ed è completamente negativo per MMP-9, il tessuto endometriosico esprime elevati livelli sia di MMP-2 che di MMP-9, mentre entrambe le metalloproteasi non sono spiccatamente presenti nel carcinoma endometrioide dell'endometrio (Shaco-Levy R, 2008). Negli ultimi anni i ricercatori hanno concentrato la loro attenzione sulla suscettibilità genetica di manifestare il carcinoma dell'endometrio e anche in questo caso i risultati non sono concordi. Uno studio condotto in Cina su 1.037 soggetti con diagnosi di carcinoma endometriale e 1.018 controlli ha concluso che tutti e 30 i polimorfismi studiati delle metalloproteasi MMP-1, MMP-3, MMP-7 non sono risultati significativamente associati al rischio di tumore dell'endometrio (Beeghly-Fadiel A, 2009). Diversi i risultati di un lavoro condotto in Taiwan l'anno successivo che ha studiato l'influenza dei polimorfismi genetici di MMP-2, MMP-3 e MMP-7 sulla suscettibilità al cancro dell'endometrio per 118 pazienti malati, rispetto a 229 controlli. Lo studio conclude che gli individui con genotipo MMP-7-181 G/G e A/G possono avere rischio aumentato di sviluppare il cancro dell'endometrio (Yu-Chiao Yi, 2010).




*Metalloproteasi della matrice (MMP) promuovono la proliferazione delle cellule tumorali e l'invasione attraverso il degrado strutturale dei componenti della matrice extracellulare (ECM).*

## INIBITORI DELLE METALLOPROTEASI

L'attività delle MMP può essere inibita da inibitori sintetici o naturali. I primi includono agenti chelanti come EDTA, 1,10 fenantrolina o anticorpi inibitori, mentre gli ultimi includono specifici inibitori tissutali delle MMP, i TIMP, ed inibitori non specifici, come l'α2-macroglobulina e l'α1-antiproteasi. L'α2-macroglobulina è una molecola presente in gran quantità in tutti i distretti dell'organismo e può essere importante per il controllo dell'attività proteolitica globale.

La famiglia di proteine multigeniche chiamate TIMP (*Tissue-Inhibitor Matrix Metalloproteinases*) hanno dimostrato di inibire le MMP completamente attivate. Gli inibitori tissutali delle MMP comprendono almeno 4 membri, e, insieme, forniscono un meccanismo strettamente regolato per il controllo dell'attivazione delle MMP e del loro funzionamento (Clark IM, 2008). L'inibitore tissutale TIMP-1 e TIMP-2 hanno un peso molecolare di 28,5 e 21,0 kd, rispettivamente, e sembrano agire attraverso la formazione di complessi a rapporto stechiometrico 01:01 con la MMP attiva. Il TIMP-1 sembra essere in grado di inibire la collagenasi MMP-3, e le gelatinasi. Il TIMP-2 si lega preferenzialmente alla MMP-2, ma inibisce anche l'attività di MMP-1, MMP-3, MMP-7, e MMP-9. L'equilibrio tra MMP e i relativi inibitori tissutali svolge un ruolo vitale nel mantenere l'integrità dei tessuti sani. Disturbi nell'equilibrio di MMP e TIMP si trova in condizioni patologiche, tra cui l'artrite reumatoide, parodontite e in corso di malattia neoplastica.

Il ruolo del TIMP nelle lesioni potenzialmente maligne è molto complessa e il degrado ECM è fondamentale nella diffusione delle cellule maligne e delle metastasi (O-Charoenrat P, 2001). Il TIMP-1 preferenzialmente inibisce l'attività della collagenasi-

1, mentre il TIMP-2 è capace di inibire tutte le metalloproteasi, in particolare è un forte inibitore della gelatinasi A e B (per la gelatinasi A è un attivatore quando presente a basse concentrazioni ed un inibitore alle alte concentrazioni). I TIMP-1 e -2 sono stati dimostrati inibire la crescita tumorale e le metastasi in animali e in studi di colture cellulari. Uno studio condotto su 50 pazienti con carcinoma dell'endometrio, dimostra come l'espressione di MMP-2 aumenta e l'espressione di TIMP-2 si riduce con il progredire del grado istologico. Inoltre l'espressione di MMP-2 è correlata con le metastasi dei linfonodi, mentre l'espressione di TIMP-2 è correlata anche con la profondità dell'invasione miometriale e l'invasione degli spazi vasculo-linfatici. Alti livelli di MMP-2 e bassi livelli di TIMP-2 sono il maggiore marcatore dei tumori endometriali con elevato rischio di diffusione locale e a distanza (Graesslin O, 2006 a). Diversamente dagli altri membri della famiglia dei TIMP, il TIMP-3 si trova legato alla matrice ed è espresso in vari tessuti normali adulti e durante lo sviluppo embrionale, nella pelle, e nel cancro mammario e del colon. Il TIMP-4 è espresso nel cuore dell'adulto, nel rene, nella placenta, nel colon e nei testicoli.

Sebbene la funzione fisiologica meglio conosciuta per i TIMP è la loro capacità di regolare la proteolisi della matrice extracellulare mediata dalle MMP, recentemente sono state riconosciute altre importanti funzioni. Infatti TIMP-1 e TIMP-2 hanno attività eritroide potenziante e sono capaci di stimolare la crescita di vari tipi di cellule, compresi cheratinociti e fibroblasti. Infine l'aumentata espressione di TIMP-3 induce neo-sintesi di DNA e promuove la morte cellulare attraverso processi di apoptosi in cellule umane di carcinoma del colon. TIMP-1 e -3 sono inoltre capaci di inibire l'angiogenesi attraverso il blocco della risposta cellulare endoteliale ai più importanti fattori angiogenetici.

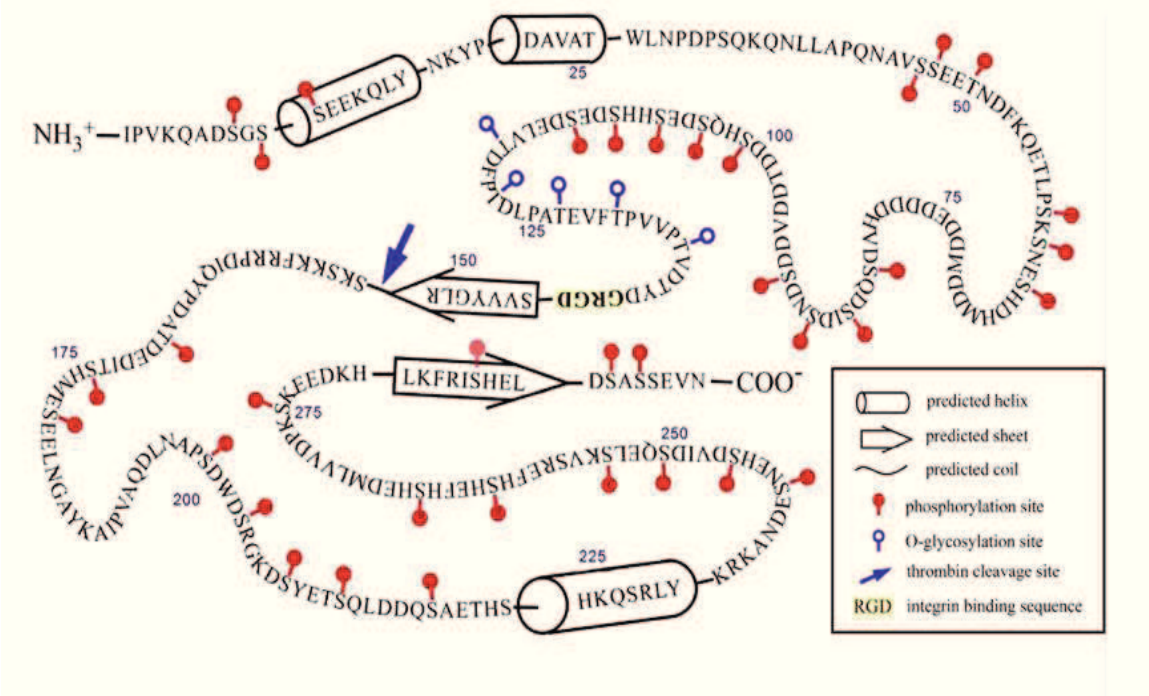
Soltanto in un lavoro scientifico, svolto in Finlandia su 93 pazienti che presentavano un carcinoma dell'endometrio, un'alta concentrazione sierica di TIMP 1 è stata associata a ridotta sopravvivenza e maggiore rischio di recidive, quindi ad una prognosi avversa (Honkavuori M, 2008).

Variazioni nei livelli di espressione e di attivazione delle MMP svolgono un ruolo chiave nei processi sopradescritti e variazioni spontanee nella sequenza del DNA dei promotori dei geni delle MMP possono modularne l'attività trascrizionale. Dette variazioni geniche, possono contribuire almeno in parte alle forti differenze inter-individuali osservate in numerose malattie croniche quali le patologie cardiovascolari e della cute ed il cancro. Alcune di queste varianti geniche sono state identificate e associate con la suscettibilità e/o la progressione di aterosclerosi, aneurisma e cancro. Quindi questi geni potrebbero essere considerati ottimi candidati per studi sulla suscettibilità di patologie che coinvolgono una attiva degradazione/rimodellamento della matrice extracellulare.

## OSTEOPONTINA

L'Osteopontina è una sialoproteina, *chemokine-like*, facente parte della famiglia dei SIBLING (***S**mall **I**ntegrin **B**inding **LI**gand **N**-linked **G**lycoprotein*) e costituisce un elemento della matrice extracellulare mineralizzata di ossa e denti. E' biosintetizzata da vari tipi di cellule fra cui preosteoblasti, osteociti, cellule endoteliali ed è conosciuta anche col nome di sialoproteina ossea I (BSP I o BSPN), fattore di attivazione precoce dei linfociti-T (ETA-1), fosfoproteina secreta di tipo 1 (SPP-1), 2AR e resistenza alla Rickettsia (Ric).

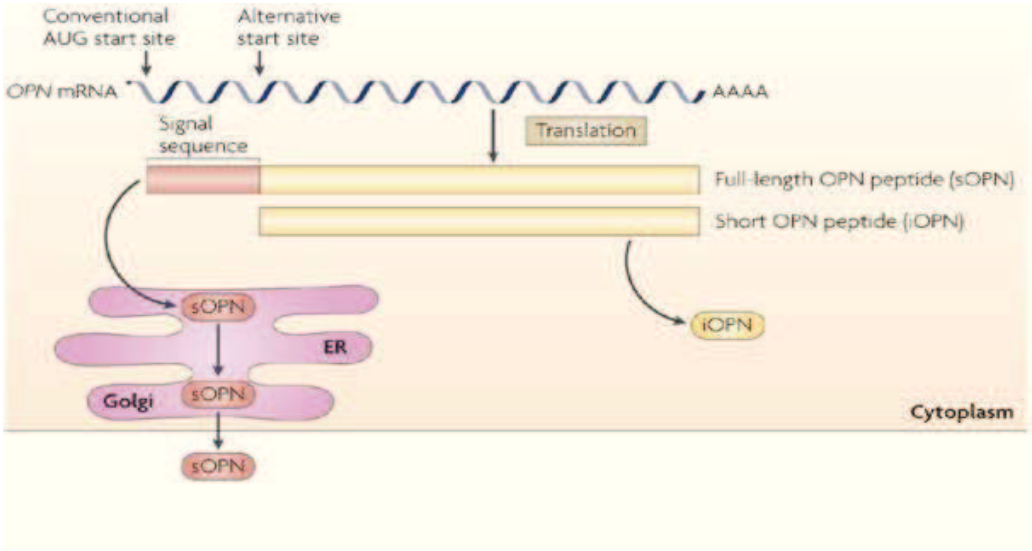
Il gene che codifica per l'OPN si trova nella regione 13 del braccio lungo del cromosoma 4 (4q13), è composto da sette esoni e si estende per 8 Kbasi. L'OPN contiene circa 314 residui aminoacidici, e il peso molecolare di OPN e delle isoforme associate è stato calcolato tra i 41 e 75 kDa. La struttura secondaria di OPN è composta da otto *α-eliche* e sei *β-sheet*. L'OPN contiene al suo interno una sequenza glicina-arginina-glicina-aspartato-serina (GRGDS o RGD). Questa sequenza GRGDS è un motivo *integrina-binding* comune a molte proteine della matrice extracellulare (ECM), che possono mediare il legame cellulare. Motivi altamente conservati all'interno della sequenza totale includono un sito di *thrombin-cleavage*, uno dominio GRGDS *integrina-binding* (glicina-arginina-glicina-aspartato-serina) e una regione ricca di aspartato. OPN contiene anche un motivo di acido poliaspartico che si può legare a idrossiapatite e gli ioni calcio. Inoltre, il sito *thrombin-cleavage* è molto vicino alla regione GRGDS (la regione GRGDS in OPN è solo sei residui dal sito *thrombin-cleavage*). Un motivo prolina leucina-valina (LPV) si verifica al NH2-terminale della sequenza di OPN.




*Struttura dell'Osteopontina*

L'analisi del cDNA di OPN suggerisce che la presenza di tre isoforme di OPN dovute a *splicing* alternativo del RNA, la variante con la lunghezza completa (OPN-FL) può essere modificata attraverso clivaggio da parte della trombina, ciò fa sì che vengano esposti dei siti nascosti, SVVYGLR nella forma clivata della proteina che prende il nome di OPN-R; questa possiede un epitopo per i recettori delle integrine α4β1, α9β1 e α9β4 ; questi, sono presenti su un certo numero di cellule immunitarie come mastociti, neutrofili e cellule T, ma anche su monociti e macrofagi. La variante OPN-R può a sua volta essere scissa dalla carbossipeptidasi B e, per perdita del residuo di arginina C-terminale, diventare OPN-L, le cui funzioni sono sconosciute. Esiste anche una variante intracellulare di OPN (iOPN) coinvolta in numerosi processi cellulari tra cui la migrazione, la fusione e la motilità. L'OPN si genera usando un sito d'inizio traduzione

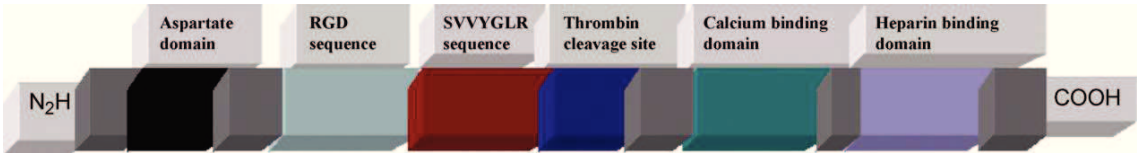
alternativo degli stessi tipi di RNA impiegati per la formazione della proteina extracellulare, situato a valle della sequenza N-terminale del segnale per il targeting del reticolo endoplasmatico.




*Clivaggio della variante lunga dell'Osteopontina*
*nella forma corta che possiede funzioni diverse.*

L'OPN agisce legandosi a particolari recettori, per lo più integrinici contenenti la subunità $\alpha_V$ . Gli effetti biologici derivanti dall'interazione con OPN sono mediati da integrine distinte. Particolarmente notevole è il requisito dell'integrina $\alpha_v\beta_3$ per la motilità mentre altre integrine sono principalmente coinvolte nell'adesione cellulare. Il recettore non-integrinico per CD44 ha dimostrato di esistere diverse varianti di *splicing*, uno solo (esoni v4, 5, 6, 9) di questi serve come un recettore OPN. Il legame tra OPN e CD44 è coinvolto nella sopravvivenza delle cellule ed è necessario per la migrazione

OPN-mediata (Denhardt DT, 1993 - Wai PY, 2004 - El Tanani MK, 2006 - Rangaswami H, 2006 - Desai B, 2007).




*Struttura dell'Osteopontina e i suoi domini funzionali. D = Aspartato, R=Arginina, S = Serina, V = Valina, Y = Tirosina, G = Glicina, L = Leucina, I = Isoleucina (El-Tanani MK, 2006).*

| OPN Receptor | Features |
|---|---|
| αVβ1 | Adhesive receptor |
| αVβ3 | Involved in angiogenesis and cell motility |
| αVβ5 | Involved in cell motility |
| α4β1 | Involved in leukocyte adhesion |
| α5β1 | May be involved in the progression of atherosclerosis |
| α8β1 | May be involved in matrix deposition/ adhesion |
| α9β1 | Binds cryptic site exposed by thrombin cleavage |
| CD44 | Associated with tumor progression |

*Recettori per l'osteopontina (Myers DL, 2004).*

E’ presente in tutti i mammiferi superiori avente il mantenimento dell’omeostasi delle ossa e di alcuni processi del sistema immunitario quali adesione, chemiotassi e trasduzione dei segnali e possiede effetti anti- e proinfiammatori, come si evince dalla sua espressione su cellule T ed NK e sui macrofagi. Inoltre è coinvolta nei processi di riassorbimento osseo, essendo prodotta e depositata dagli osteoblasti e legandosi all’idrossiapatite fornisce la struttura di base della matrice ossea ma anche dei calcoli renali. In seguito al legame con l'integrina αvβ3, essa induce chemioattrazione degli osteoclasti sulla matrice e inibisce la neoapposizione di tessuto osseo da parte degli osteoblasti.

L'osteopontina è prodotta in una varietà di cellule e tessuti quali : osteoblasti, osteociti, macrofagi, nel tessuto dell'orecchio interno, del cervello, dei reni, della placenta, del midollo osseo, della cartilagine, del muscolo liscio e dell’endotelio. Viene espressa in vari tumori come quello del polmone, mammella, prostata, testa e collo, colon, stomaco, fegato (Takafuji V, 2007), carcinoma ovarico, tumore della pelle e il mesotelioma (Weber GF, 2010 a). Alcuni tumori secernono osteopontina per la propria sopravvivenza ed elevati livelli sierici della molecola sono spesso associati a metastasi ossee. In particolare, nel mieloma multiplo l'espressione e la solubilizzazione di osteopontina da parte delle plasmacellule correlano con l'estensione delle lesioni osteolitiche.

## Proprietà strutturali e funzionali

L'OPN è una fosfoglicoproteina di circa 60 kDa, costituita da 314 aminoacidi. Come già accennato, essa è stata isolata dalla matrice ossea extracellulare, ma viene espressa anche da diversi tipi cellulari tra cui osteoblasti, osteoclasti, macrofagi, linfociti T

attivati, cellule muscolari lisce, epiteliali e gangliari ed è componente strutturale di alcuni tessuti quali midollo, placenta, rene ed epiteli secretivi. In forma solubile è presente in vari liquidi biologici tra cui sangue, urine e latte, e partecipa in maniera attiva a eventi fisiopatologici quali il rimodellamento osseo, l'angiogenesi, la cicatrizzazione e alcuni processi flogistici dell'apparato osteo-scheletrico. La principale funzione dell'OPN riguarda i meccanismi di adesione intercellulare. A questo scopo, la proteina esprime una sequenza aminoacidica Gly-Arg-Gly-Asp-Ser capace di attivare l'adesività di osteoblasti, osteoclasti e fibroblasti con alcune integrine (αvβ1- β3-β5) e, al tempo stesso, di implementare la chemiotassi e la trasduzione intracellulare di specifici segnali. Il legame molecolare dell'OPN con le suddette integrine è inoltre responsabile dell'attivazione di specifiche tirosinchinasi, che trasducono segnali specifici in risposta a stimoli intra- ed extracellulari. L'adesione cellulare è altresì mediata dal legame dell'OPN con molecole diverse dalle integrine come il CD44, una glicoproteina di superficie che consente l'adesività diversificata tra cellula e substrato, ma anche tra cellula e cellula. Questa molecola è iper-regolata in corso di processi flogistici acuti e cronici e lega l'OPN con le varianti CD44v6 e CD44v7 (Desai B, 2007). Il clivaggio dell'OPN ad opera della trombina è di notevole interesse, in quanto la proteina idrolizzata espone un sito di legame per le integrine α9β1 e α4β1, identificato nella sequenza SVVYGLR, non altrimenti visibile ai recettori specifici sul peptide in tutta la sua lunghezza. Le proprietà funzionali dell'OPN clivata differiscono da quelle della proteina nativa, confermando l'importanza del clivaggio proteolitico quale meccanismo di induzione della bioattività dell'OPN. La maggior parte dell'OPN circolante è scissa dalla trombina durante i processi di coagulazione sia in condizioni fisiologiche che durante processi flogistici, neoplastici e di riparazione tissutale. E' stato osservato che l'OPN aumenta nella tonaca muscolare delle arterie a seguito di eventi

flogistico-traumatici contemporaneamente all'attivazione della trombina. Inoltre l'OPN funge da substrato per le metalloproteasi MMP-3 (stromelysin-1) e MMP-7 (matrilysin), esponendo siti di clivaggio differenziati per le due metalloproteasi, sebbene entrambe utilizzino un sito adiacente a quello per la trombina nella porzione N-terminale (Pazolli E, 2009). L'azione proteolitica delle metalloproteasi genera in tutto cinque frammenti, uno dei quali è compreso tra quelli N-terminali e contiene la sequenza RGD.

Il ruolo biologico delle modificazioni proteolitiche dell'OPN è dimostrabile *in vitro* con l'induzione di una maggiore adesione e migrazione cellulare in modelli sperimentali che utilizzano tessuti flogistici o cellule di tumori solidi. L'espressione e l'attivazione delle metalloproteasi è infatti significativamente aumentata in vari processi patologici e l'anomala regolazione di metalloproteasi e OPN è constantemente riscontrabile nel fisiologico rimodellamento tissutale e nelle linee cellulari tumorali caratterizzate da una esaltazione dei processi proliferativi.

Legandosi ai suoi recettori, l'osteopontina funge a diversi livelli fisiologici:

- **OSSO**: nell'osso, OPN ha dimostrato sia di facilitare sia di opporsi al riassorbimento osseo. E' implicata nel rimodellamento dell'osso, in particolare l'OPN svolge un ruolo nell'ancoraggio degli osteoclasti alla matrice minerale ossea, inoltre avvia il processo attraverso cui gli osteoclasti sviluppano le loro *ruffled borders* (orletto a spazzola) per iniziare il riassorbimento osseo. L'espressione di OPN è richiesta per il riassorbimento osseo in risposta all'ormone paratiroideo e per la diminuzione dello stress meccanico, e topi OPN *null* sono resistenti al riassorbimento osseo indotto dall' ovariectomia. Tuttavia, l'effetto di OPN sulla mineralizzazione sembra essere conformazione-dipendente come il trattamento di OPN con fosfatasi aumenta la mineralizzazione. L'induzione di OPN in risposta allo stress è stata osservata nelle

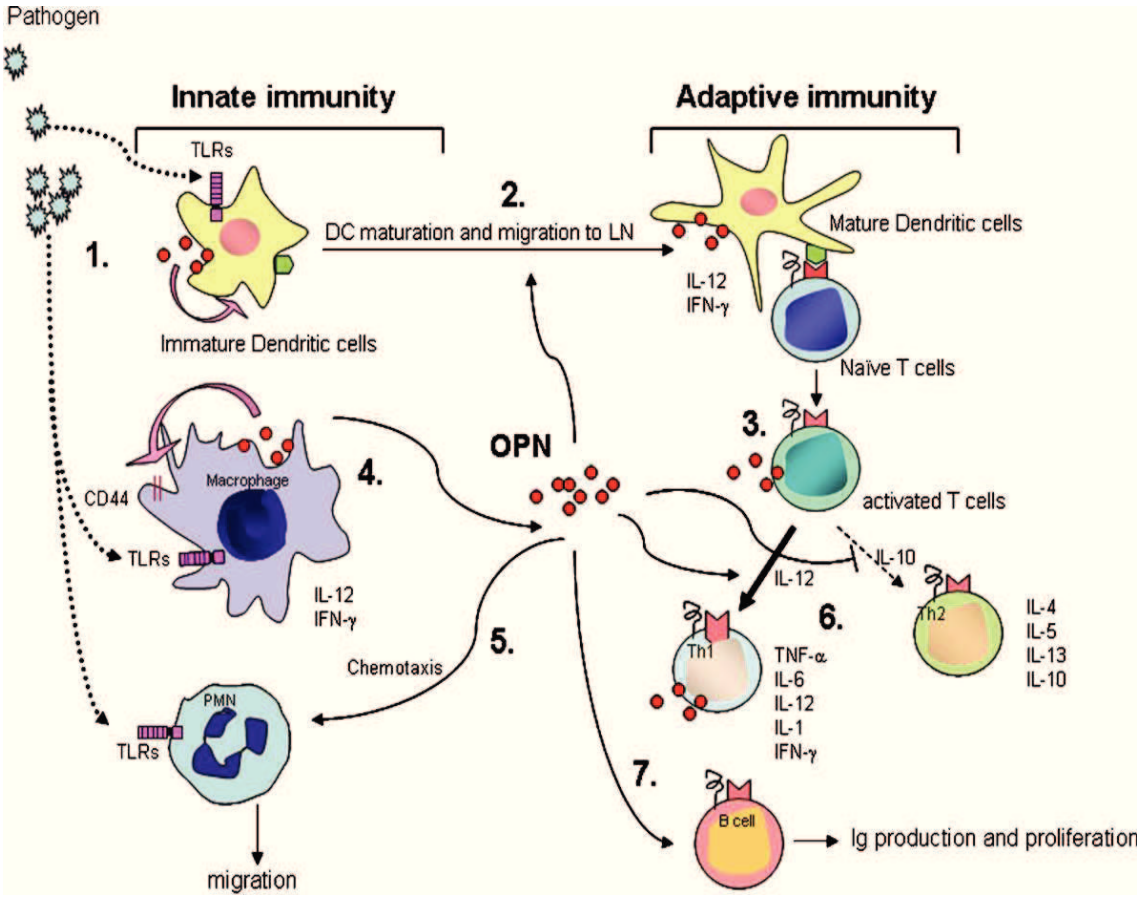
cellule ossee. In vitro, OPN è indotta con la stimolazione meccanica degli osteoblasti, e le cellule ossee e OPN *null* sono difettose nella produzione di ossido nitrico in risposta al pulsatile flusso del fluido (Myers DL, 2004).

- **RENE**: Osteopontina può non giocare un ruolo essenziale durante lo sviluppo, perché in topi OPN-deficienti, lo sviluppo del rene è del tutto normale, e istologicamente il rene non ha alcuna evidenza di anomalie, anche se l'aggiunta di anticorpi anti-OPN in culture dell'organo metanefrico impedisce al blastema metanefrico di andare verso la normale tubulogenesi. Inoltre l'osteopontina non avrebbe un ruolo essenziale nella funzione delle cellule renali, infatti, i suoi livelli nel tessuto renale sono molto bassi, ciononostante si trovano elevati livelli di OPN nelle urine. Si pensa che l'osteopontina abbia un ruolo sia nel prevenire sia nel favorire la calcolosi renale. Da un lato, è stato dimostrato che l'uropontina, la forma urinaria di OPN, riduce la crescita e l'aggregazione dei cristalli di ossalato di calcio, e blocchi il legame dei cristalli alle cellule epiteliali renali. L'uropontina inibisce l'aggregazione dell'ossalato di calcio monoidrato (COM) ed inoltre favorisce anche la formazione di ossalato di calcio diidrato (COD), che rispetto al COM è meno (50%) aderente alla cellule epiteliali renali, suggerendo che sia grazie a questo che l'osteopontina impedisca la nefrolitiasi da cristalli di calcio. Alcuni studi suggeriscono che l'OPN svolge un ruolo importante nel processo di formazione di calcoli. In vitro, la concentrazione di $Ca^{2+}$ nei cristalli di ossalato di calcio che aderiscono al rene canino di *Madin-Darby* (MDCK) era di circa 1,4 volte maggiore nelle cellule MDCK incubate con OPN che in un gruppo di controllo; dagli studi fatti si è giunti alla conclusione che la forma di OPN intatta nella matrice extracellulare può essere la causa della deposizione di cristallo di ossalato di calcio sulla superficie delle cellule MDCK, mentre la *thrombin-cleaved* OPN può inibire la deposizione di cristallo di ossalato di calcio (Xie Y, 2001).

- **SISTEMA IMMUNE:** Immunità innata: il ruolo dell' osteopontina nell'immunità innata si riflette nel suo ruolo di protezione dalle malattie infettive. Essa contribuisce alla difesa della mucosa dai patogeni virali. I monociti esprimono un basso livello di OPN, ma appena si differenziano in macrofagi l'espressione di OPN è aumentata; diventa costitutivamente espresso nei macrofagi e può essere ulteriormente up-regolata da stimoli quali LPS. OPN è stato dimostrato regoli diverse funzioni fra cui la migrazione dei macrofagi, l'attivazione, la fagocitosi, la produzione di citochine proinfiammatorie e la sintesi di ossido nitrico in risposta a diversi problemi infiammatori. Nei macrofagi OPN regola sia la distribuzione di CD44 e, come iOPN, si co-localizza con CD44 sulla superficie interna della membrana plasmatica (Desai B, 2007). I macrofagi OPN-carenti hanno una distribuzione più diffusa di CD44, suggerendo che CD44 collabora con OPN nella regolazione della migrazione dei macrofagi. Nei siti di danno tissutale, l'OPN prodotta dai macrofagi favorisce l'adesione cellulare e può agire come una opsonina facilitando la fagocitosi di corpi estranei. E 'stato dimostrato nei macrofagi che un'interazione fosforilazione-dipendente tra il frammento trombina amino - terminale di OPN e il suo recettore integrinico stimola l'espressione di IL-12, mentre una interazione fosforilazione-indipendente della metà C-terminale con CD44 inibisce l'espressione di IL-10. L'implicazione è che l'interazione di OPN con le integrine e CD44 stimola attraverso modelli differenti vie di trasduzione del segnale distinte quali l'espressione di citochine / chemochine e la risposta immunitaria specifica (Desai B, 2007). L'OPN è anche un fattore chemiotattico per i neutrofili. I neutrofili attivati rilasciano proteasi, le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, e mediatori citotossici che, in combinazione con la fagocitosi eliminano gli agenti infettivi invasori. Le cellule dendritiche (DC) sono l'unica popolazione cellulare immunitaria che funge da collegamento tra l'immunità innata e adattativa. Esse

funzionano come cellule effettrici del sistema immunitario innato per fornire la prima linea di difesa attraverso il riconoscimento non specifico dei patogeni invasori. L'OPN è altamente espressa nelle DC immature, ma diminuisce la produzione durante la maturazione; OPN agisce in modo autocrino e / o paracrino per indurre la maturazione delle DC. Come lo è per altre cellule infiammatorie, OPN è anche un fattore di sopravvivenza per le cellule dendritiche. Le DC OPN-attivate producono IL-12 e TNF-α, e quando incubati con cellule T naïve, possono indurre la polarizzazione delle cellule T naïve in Th1. La presenza di OPN nelle interazioni cellule T-DC può influenzare decisamente la polarizzazione delle cellule T.

Immunità cellulo-mediata: L'OPN è prodotta dalle cellule T attivate ed è classificata come una citochina Th1 perché modula l'immunità cellulo-mediata, promuovendo la risposta Th1. Nelle cellule-T $CD^{4+}$, OPN mRNA è espresso nelle cellule polarizzate verso i Th1, ma non Th2. Inoltre, la forma solubile di OPN può modulare la differenziazione e la proliferazione delle cellule T $CD^{4+}$ e $CD^{8+}$. L'OPN può anche stimolare le cellule T del sangue periferico umano di esprimere IFN-γ e CD40L, che successivamente inducono l'espressione di IL-12 dai monociti; l'espressione di CD40L da parte delle cellule T può spiegare la capacità di OPN di indurre la proliferazione delle cellule B e la produzione di anticorpi. A basse concentrazioni, OPN promuove la chemiotassi ma non la chemocinesi delle cellule T, mentre l'adesione delle cellule T attivate è aumentata ad alte concentrazioni di OPN, soprattutto a seguito della scissione di OPN da parte della trombina (Wang KX, 2008).



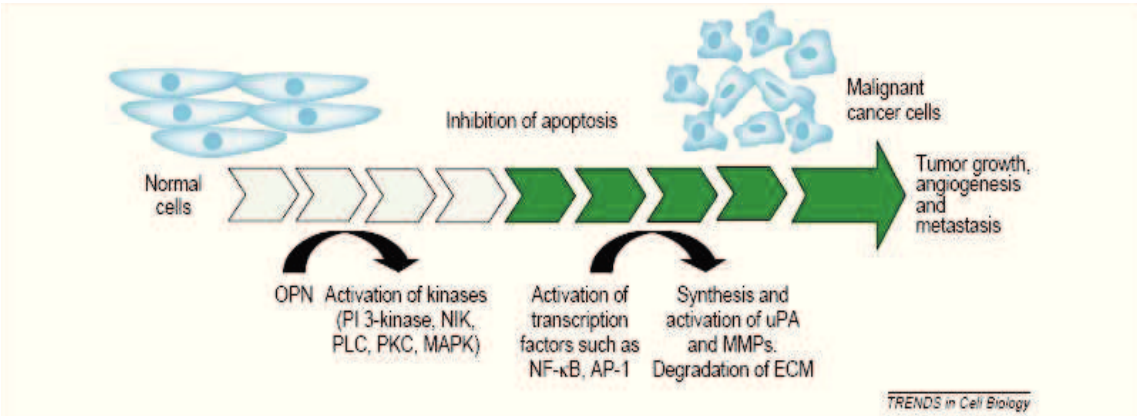

*Ruolo di OPN nella regolazione dell'immunità innata e adattativa (Wang KX, 2008).*

## Funzioni nella progressione tumorale

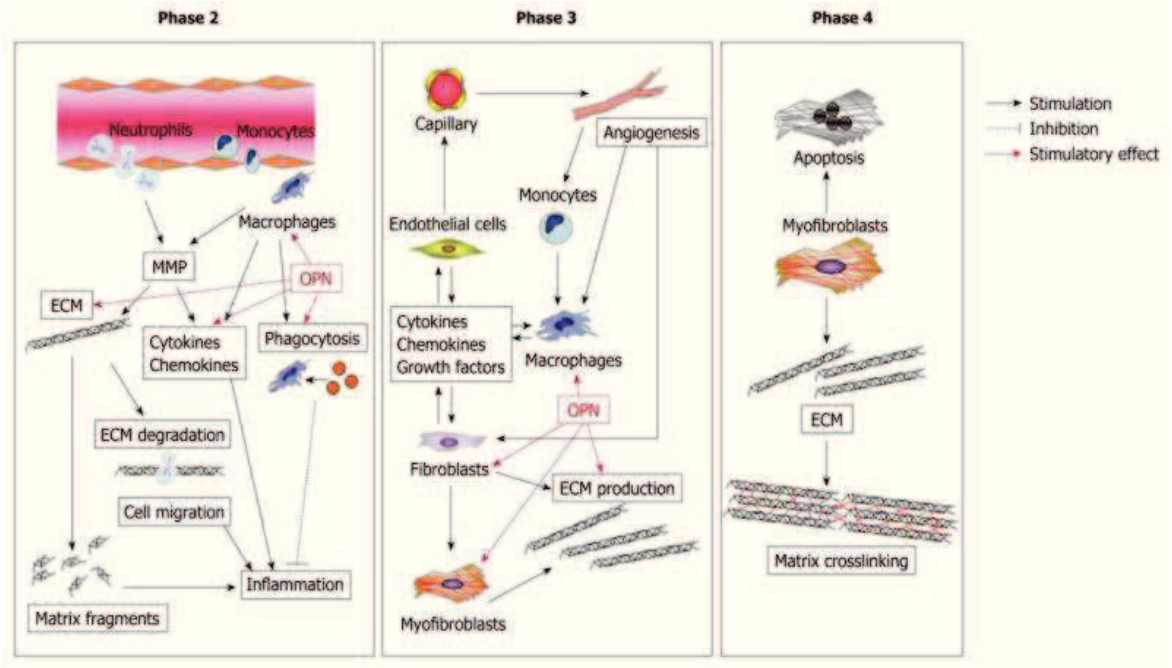
Esistono prove che suggeriscono le funzioni di OPN nella regolamentazione delle metastasi tumorali. La funzione specifica di OPN nella fisiopatologia del tumore è complessa e sconosciuta. La comprensione dei meccanismi di base è complicata dal rilevamento di OPN nei macrofagi che infiltrano il tessuto tumorale. L'OPN prodotta dalle cellule tumorali e dai macrofagi sembra offrire segnali differenti (Rangaswami H,

2006); l'OPN prodotta dai macrofagi funziona nel reclutamento delle cellule immunitarie e riduce la crescita del tumore, mentre OPN tumore-derivata sembra inibire la funzione macrofagica e aumentare la crescita tumorale. Questi dati suggeriscono che in vivo la funzione di OPN è multiforme, tessuto-specifica, e coinvolge molteplici vie di segnalazione che hanno effetto sia sulle cellule del sistema immunitario nell'*host-defense* sia nelle cellule trasformate nell'invasione tumorale. I *signaling pathways* attivati da OPN sono mediati da recettori per l'integrina $\alpha_v\beta$ e CD44.

L'OPN potrebbe contribuire alla progressione del cancro attraverso la regolazione del meccanismo di sorveglianza e del tumore, inibendo l'apoptosi delle cellule neoplastiche attraverso la regolazione di alcune chinasi. La fosfatidil inositolo 3-chinasi (PIK-3) è attivata da alcune sollecitazioni fisiche, chimiche e genotossiche. Una delle molecole target a valle della PI 3-chinasi è Akt. Akt è una serin / treonin chinasi ed è nota come protein chinasi B (PKB) o RAC-PK (*'related to A and C protein kinase'*). Akt regola la progressione del ciclo cellulare, la sopravvivenza delle cellule mediata dai fattori di crescita, la migrazione cellulare e la crescita ancoraggio-indipendente delle cellule tumorali. OPN induce l'attività di PI 3-chinasi e la fosforilazione di Akt PI 3-chinasi-dipendente attraverso la via mediata dall'integrina $\alpha_v\beta_3$.




*Ruolo dell'osteopontina nella progressione tumorale (Rangaswami H, 2006).*




*Ruolo dell'osteopontina nella progressione tumorale*
*e nella chemiotassi leucocitaria durante i processi di infiammazione.*

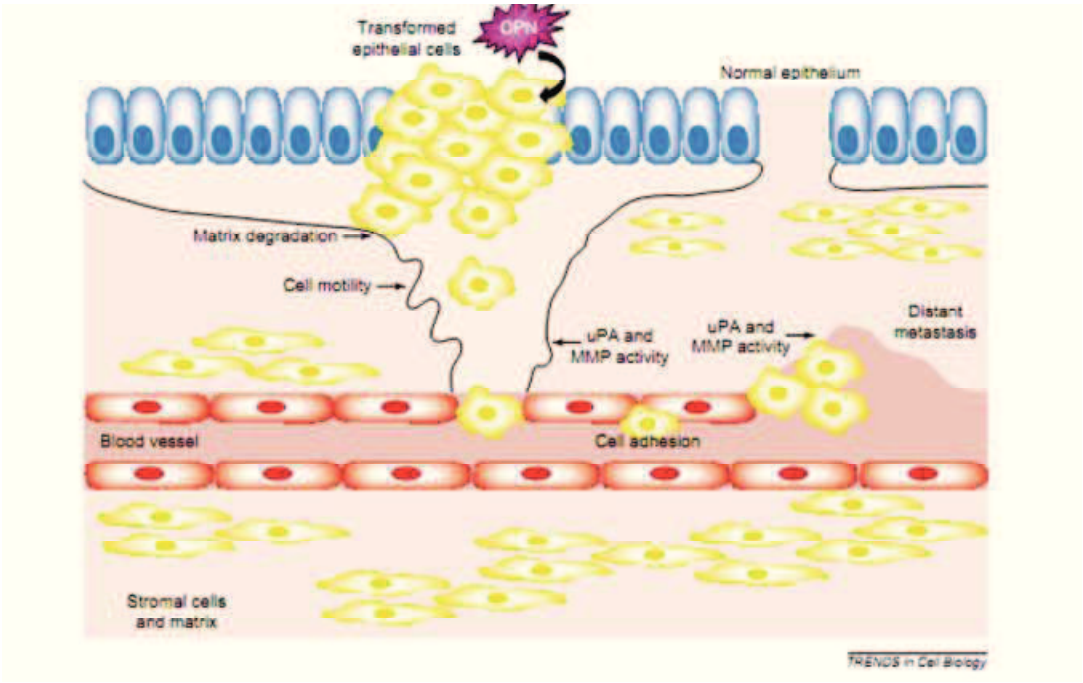
L'OPN gioca un ruolo importante nell'adesione cellulare e conferisce l'invasività e la capacità metastatica delle cellule tumorali. L'Osteopontina media l'adesione cellulare attraverso il *signaling* delle integrine, mediata dalle integrine $\alpha_v\beta_{1,\,3,\,5}$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$ e $\alpha_8\beta_1$. Di queste, le integrine $\alpha_v\beta_3$ hanno particolare importanza insieme al recettore per CD44. Il legame di OPN alle integrine è GRGDS-dipendente, ma per CD44 si lega in modo GRGDS-indipendente e richiede la cooperazione delle integrine contenenti la subunità $\beta_1$ per legarsi a domini multipli e stimolare la motilità.

Per quanto riguarda la migrazione cellulare OPN induce l'aumento della migrazione delle cellule e dell'espressione del mRNA dell'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasico (u-PA). Durante la migrazione delle cellule tumorali, OPN-mediata, vi è un aumento dell'espressione del mRNA dell'*EGFreceptor* (EGFR), l'attività tirosin-

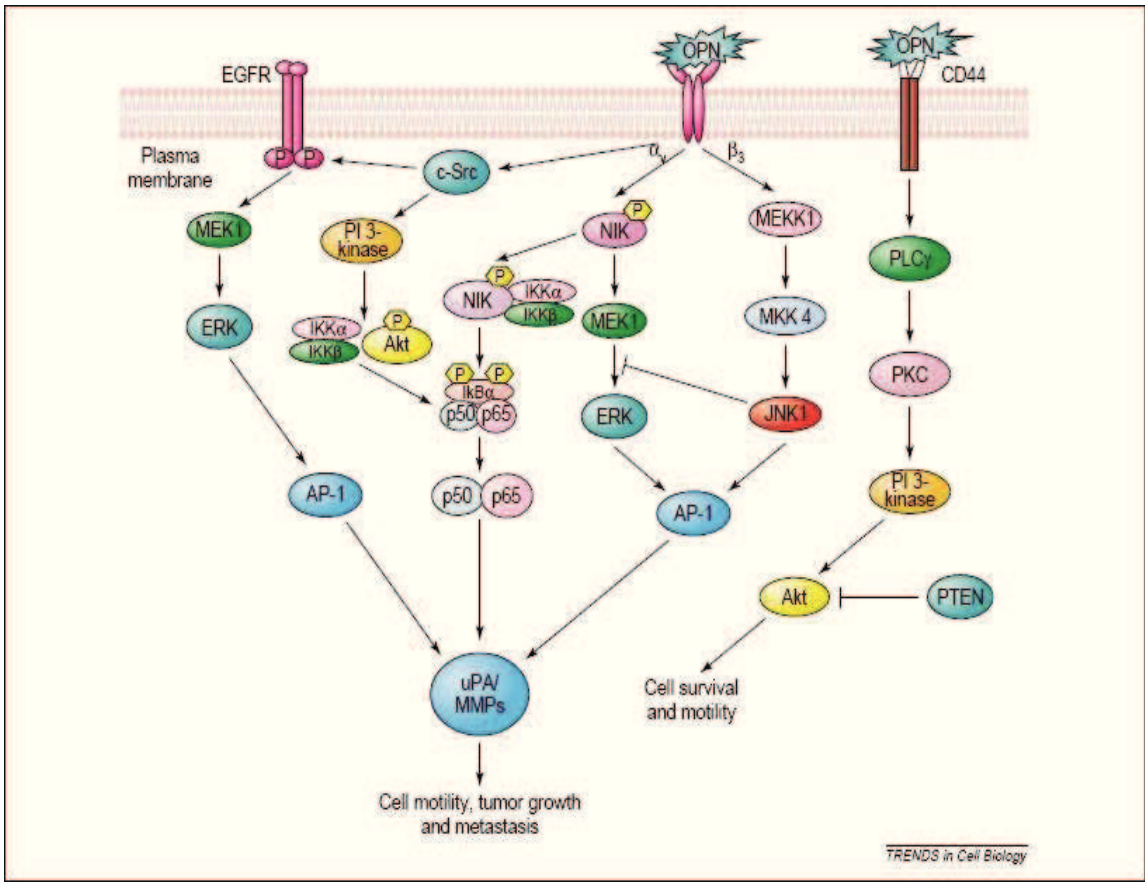
chinasica di EGFR, espressione di mRNA del recettore HGF (Met) e attività chinasica della Met. L'OPN aumenta anche la migrazione delle cellule attraverso l'interazione tra integrine e recettori u-PA/u-PA (u-PAR) e / o induzione integrina-mediata di u-PA.

Uno dei passaggi chiave coinvolti nel processo di carcinogenesi e metastatizzazione è la degradazione della membrana basale e della matrice interstiziale. La degradazione e il rimodellamento della matrice extracellulare (ECM), sono solo alcuni dei passaggi essenziali coinvolte nella migrazione cellulare e nella progressione tumorale.

I vari enzimi che degradano ECM includono: (a) metalloproteasi della matrice (MMP), già considerate in precedenza, (b) proteasi di membrana ADAM-correlate, (c) metalloproteasi morfogenetica dell'osso di tipo-1 e (d) serina-proteasi tissutali, tra cui l'attivatore tissutale del plasminogeno, urochinasi, trombina e della plasmina. Tra questi tipi di enzimi i più studiati sono quelli della famiglia delle metalloproteasi della matrice, in particolare le MMP -2 e -9 dette anche gelatinasi A e B (El-Tanani MK, 2006 - Rangaswami H, 2005 - Rangaswami H, 2006).




*Modello raffigurante il ruolo di osteopontina (OPN) nella regolazione dell'attivatore del plasminogeno urochinasi (uPA) e l'attivazione delle metalloproteasi della matrice (MMP) durante la progressione tumorale e metastatizzazione (Rangaswami H, 2006).*




*Meccanismi molecolari di crescita tumorale e metastatizzazione osteopontina indotta (OPN) attraverso pathways integrina $\alpha_v\beta_3$/CD44-mediati (Rangaswami H, 2006).*

Elevati livelli sierici di OPN sono stati più volte dimostrati nel corso di neoplasie a diffusione ossea quali i carcinomi della mammella, della prostata (Khodavirdi AC, 2006 – Ramankulov A, 2007 – Tomlins SA, 2007 - Castellano G, 2008), della tiroide e del polmone (infatti, i livelli plasmatici della glicoproteina sono solitamente aumentati in pazienti con carcinoma della prostata non responsivo al trattamento ormonale ed in pazienti con carcinoma mammario con metastasi ossee). Inoltre è stata localizzata nella membrana cellulare e nel citoplasma sia delle cellule del carcinoma endometrioide

dell'endometrio, che in quelle del carcinoma endometrioideo dell'ovaio, senza alcuna differenza significativa (Osaka, 2006). Il valore medio dell'OPN sierica in un gruppo di volontari sani è stato valutato intorno a 90 ng/ml, mentre esso è di 142 ng/ml in pazienti con carcinoma della prostata e carcinoma mammario. Pertanto, è verosimile che le stesse cellule tumorali producano OPN, sebbene il meccanismo con cui essa influenza l'infiltrazione ossea e la crescita tumorale non sia ancora ben definito. Alcuni studi ipotizzano che la sua interazione con αvβ3 ed altre molecole funzionali (tra cui il CD44) favorisca l'adesione, la migrazione e la crescita delle metastasi proteggendole al tempo stesso dalla sorveglianza immunologica e dall'apoptosi (Osaka, 2006). Altre osservazioni hanno dimostrato che l'OPN espleta un effetto inibitorio diretto sull'apoptosi, sia favorendo la sopravvivenza delle cellule tumorali mediante attivazione di NFkB, sia riducendo l'attività citolitica del complemento mediante il fattore H, proteina plasmatica multifunzionale, regolatrice dell'attivazione complementare e capace di reagire con ligandi multipli tra cui la stessa OPN. Infine, l'OPN è apparentemente coinvolta anche nell'angiogenesi tumorale, in quanto il legame con αvβ3 inibisce l'apoptosi delle cellule endoteliali *in vitro* mediante attivazione di NFkB, con conseguente aumento della rete vascolare ed incremento della crescita tumorale. E' stato anche dimostrato il ruolo positivo dell'OPN nell'angiogenesi associata al tumore endometriale, essendo la sua espressione elevata nelle cellule endoteliali del suddetto tumore (Xue-Lian, 2009).

L'OPN si lega specificamente a componenti della matrice extracellulare e, come tale, rappresenta il substrato per il legame con la transglutaminasi attraverso i residui di glutamina. Questo legame è probabilmente necessario per immobilizzare la proteina alla matrice extracellulare e consentire l'ancoraggio delle cellule tumorali dopo la loro fuoriuscita dal letto vascolare.

L'OPN prodotta *in vivo* dai tumori viene solubilizzata ed è pertanto dosabile nei fluidi extracellulari. Inoltre, essa viene regolarmente prodotta dai macrofagi che infiltrano i tumori in quantità maggiori rispetto alle stesse cellule tumorali, per cui l'aumento dell'espressione sierica di OPN nel corso di neoplasie correla negativamente con la progressione tumorale.

Il suo ruolo come biomarcatore tumorale è stato conclusivamente confermato in un lavoro che ne ha studiato i livelli plasmatici in soggetti affetti da carcinoma dell'endometrio. Lo studio ha concluso che i livelli di OPN sono significativamente più elevati nei soggetti affetti, rispetti ai casi controllo sani e che nel I stadio FIGO, l'osteopontina ha identificato correttamente 18 casi su 29 (62%) che non avevano il CA 125 aumentato (Cho H, 2009). In un altro recente studio è stata valutata l'osteopontina come marcatore di aggressività tumorale ed indicatore del tempo medio di sopravvivenza dei pazienti oncologici. I risultati del lavoro confermano che l'osteopontina è correlata al grado e allo stadio del tumore, che livelli elevati sono significativamente correlati alla comparsa di recidive e ad un minore tempo medio di sopravvivenza. Quindi l'osteopontina è un marcatore clinico di progressione tumorale (Weber GF, 2010 b). Un altro lavoro dello stesso autore, mette in luce che la sovra espressione dell'osteopontina si associa alla presenza di metastasi nel tumore di colon-retto, polmone, melanoma, ma non in quello dell'ovaio. Indica inoltre che essa è certamente protagonista di trasformazione neoplastica soltanto nei tumori di origine virale, dove come citochina dei linfociti TH1 gioca un ruolo importante (Weber GF, 2010 b).

# MATERIALI E METODI

Abbiamo reclutato per il nostro studio 31 pazienti che si erano sottoposte ad un esame isteroscopico o per la sintomatologia (menometrorragie, spotting intermestruale, anomali sanguinamenti in menopausa), o per ispessimento endometriale casualmente evidenziato durante un'ecografia ginecologica di controllo.

Lo stesso giorno in cui alle pazienti veniva eseguita l' isteroscopia della cavità uterina, presso il P.O. Policlinico - Vittorio Emanuele di Catania, Reparto di Ostetricia e Ginecologia, sono stati prelevati circa 10 ml di sangue venoso periferico, a digiuno e sempre nelle ore meridiane, e tale aliquota è stata suddivisa in due provette: 2-3 ml per la raccolta del siero e 6-7 ml per la raccolta del plasma, con aggiunta di $Na^{++}$ eparina. Le provette sono state quindi inviate, entro 30 minuti, presso il Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università degli studi di Catania, sezione di Patologia Clinica ed Oncologia molecolare, per la loro centrifugazione ed i campioni di plasma e siero aliquotati, sono stati conservati a -80°C, fino al momento del saggio. Prima dell'esame isteroscopico è stata raccolta l'anamnesi di ciascuna paziente, che ha indicato età, BMI, età del menarca, ritmo del ciclo o età della menopausa, eventuale assunzione di farmaci e terapia ormonale, droghe voluttuarie, malattie intercorrenti, micropolicistosi ovarica, anamnesi familiare positiva per tumori e sintomatologia attuale.

In corso di isteroscopia, anche quando l'endometrio era atrofico, sono state praticate delle biopsie della cavità uterina o dei polipi endometriali. Un piccolo frammento tissutale veniva raccolto in Rna Later, ed inviato al Dipartimento di Scienze Biomediche, sezione di Patologia Clinica ed Oncologia molecolare, dove è stato conservato ad una temperatura di -80°C fino alle indagini di biologia molecolare

(estrazione dell'RNA ed Immunoistochimica - Elisa); il restante materiale è stato inviato all'Istituto di Anatomia Patologica del Policlinico di Catania per effettuare l'esame istologico.

Di 25 delle 31 pazienti reclutate, abbiamo ottenuto sia campioni di sangue periferico che prelievi bioptici della cavità uterina. Delle restanti 6, di 3 abbiamo ottenuto solo il prelievo di sangue (2 con diagnosi isteroscopica di endometrio atrofico e 1 di polipo endometriale) e di altre 3 soltanto le biopsie della cavità uterina (tutte con diagnosi istologica di polipi fibroghiandolari). Delle 25 donne di cui abbiamo ottenuto anche i campioni di sangue, sono stati considerati quattro gruppi in base ai risultati dell'esame istologico: 1° gruppo formato da 4 donne con endometrio privo di patologia (atrofico per menopausa o regolare per la fase del ciclo), 2° gruppo formato da 14 donne con patologia benigna dell'endometrio (polipi o iperplasia senza atipie), 3° gruppo formato da 3 donne con iperplasia con atipie (di cui una con atipia focalmente al limite con l'adenocarcinoma), infine un ultimo gruppo formato da 4 donne con l'adenocarcinoma dell'endometrio.

Le notizie anamnestiche dei 4 gruppi di pazienti sono state qui di seguito riassunte.

| | Endometrio atrofico o normale | Polipi o iperplasia senza atipie | Iperplasia con atipie | Adenocarcinoma dell'endometrio |
|---|---|---|---|---|
| **Età media** | 51,5 | 53,7 | 60 | 57,5 |
| **BMI medio** | 31,9 | 30,4 | 30,9 | 26,4 |
| **N° medio di figli** | 2,25 | 2,7 | 1,6 | 1,75 |
| **Menopausa** | 1/4 | 8/14 | 2/3 | 4/4 |
| **Terapia ormonale** | 1/4 | 0 | 0 | 1/4 |
| **Fumo** | 2/4 | 5/14 | 0 | 0 |
| **Ipertensione** | 2/4 | 5/14 | 2/3 | 2/4 |
| **Diabete** | 0 | 1/14 | 1/3 | 1/4 |
| **Familiarità per tumori (endometrio, seno, colon)** | 1/4 | 7/14 | 2/3 | 0 |
| **Sintomi attuali** | 3/4 | 4/14 | 2/3 | 4/4 |
| **Ispessimento ecografico** | 2/4 | 10/14 | 3/3 | 3/4 |

## Passaggi per l'estrazione dell'RNA da un piccolo frammento bioptico

1. RnaLater: Il frammento di tessuto endometriale ottenuto tramite biopsia viene immerso in un liquido stabilizzatore dell'RNA, che ne impedisce la degradazione in attesa della sua estrazione.
2. Estrazione dell'RNA dei frammenti di tessuto endometriale tramite il metodo PURELINK RNA MINI KIT.
3. Quantificazione dell'RNA e determinazione della sua qualità.
4. Sintesi del c-DNA.
5. Amplificazione del gene interessato mediante PCR e PRIMER.

   Sono stati utilizzati i seguenti primer (5→3):

   Come gene ubiquitario, Glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) sense: ACGTGATGCAGAACCACCTACTG.

   G6PD antisense: ACGACGGCTGCAAAAGTGGCG.

   MMP9 sense: TCTTCCCTGGAGACCTGAGA.

   MMP9 antisense: CACCAAACTGGATGACGATG.

   TIMP 1 sense: CTGTTGTTGCTGTGGCTGATA.

   TIMP 1 antisense: CCGTCCACAAGCAATGAGT.

   Osteopontina sense: CTGACATCCAGTACCCTGATGC.

   Osteopontina antisense: GGCCTTGTATGCACCATTCA.
6. Quantificazione dell'espressione genica interessata (MMP9, TIMP 1, osteopontina).

   L'RNA totale cellulare è stato estratto dai frammenti di tessuto endometriale con il sistema di purificazione dell'RNA totale Micro-to-Midi (Invitrogen) secondo le istruzioni della ditta fornitrice. La reazione della trascrittasi inversa e l'amplificazione

con la PCR sono state eseguite con reattore termico Eppendorf AG22331. L'RNA totale (2,0 μg) è stato portato alla temperature di 65°C per 5 minuti e quindi raffreddato su ghiaccio. Successivamente è stata aggiunta una miscela di 20 μl contenente 0,15 μg di *random primers* (Invitrogen), tampone di trascrizione, RNasi OUT (40 unità/μl; Invitrogen), dNTP (10mM di ognuno) e trascrittasi inversa M-MLV (200 unità; Invitrogen). L'incubazione è stata eseguita a 37°C per 50 min.

L'amplificazione è stata eseguita con 2 μl di cDNA in un volume totale di 50 μl contenente un mix di 200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl, 50 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTP, 20 μM di primer specifici e 5 U/μl di Taq DNA polimerasi (Invitrogen). I primers utilizzati sono quelli del punto 5.

Inoltre sono stati eseguiti i dosaggi in ELISA su siero o plasma delle tre proteine da noi considerate, con Kits disponibili commercialmente secondo la metodica indicata dal produttore (R&D System).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I dati ottenuti dalle nostre indagini di laboratorio sono riportati nelle figure seguenti; in particolare in fig.1 sono presentati i valori ottenuti dal saggio in ELISA per MMP-9 (207 ± 33,2 ng/ml nelle donne con carcinoma, 88 ng/ml ± 10,2 ng/ml nelle patologie benigne verso i 29 ± 10,2 ng/ml nelle donne considerate come controllo).

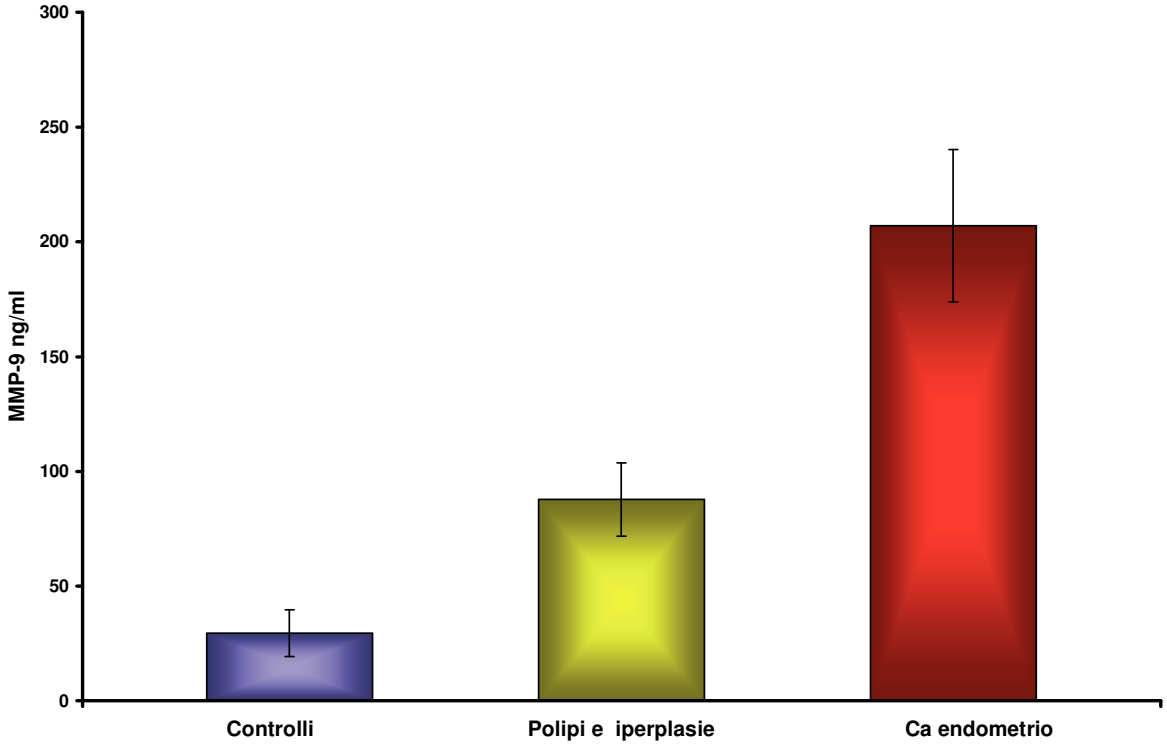



**Fig. 1** Valori medi dei livelli sierici di MMP-9, espressi in ng/ml, ± standard deviation (SD).

I valori di TIMP-1 hanno mostrato livelli sierici della proteina di 262 ± 36,1 ng/ml nelle pazienti con carcinoma, di 113 ± 25,9 ng/ml nei campioni provenienti di donne con patologia benigna e di 57 ± 14,2 ng/ml nei controlli (fig 2).

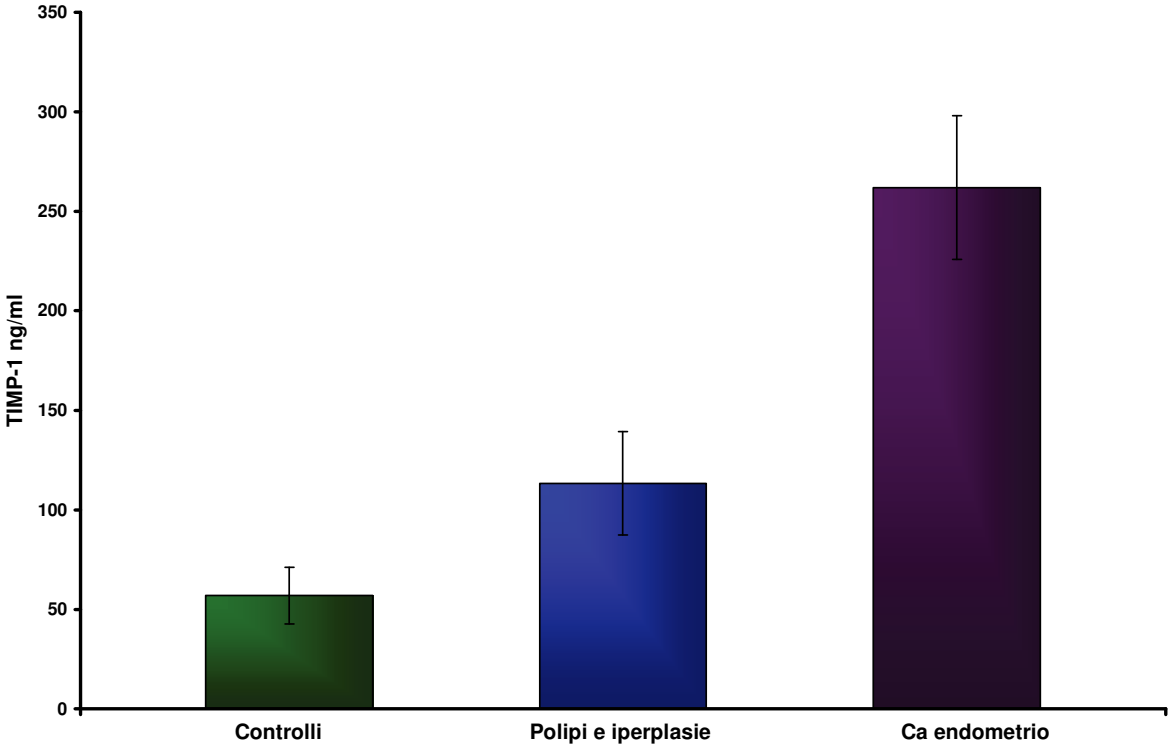



**Fig. 2** Valori medi dei livelli sierici di TIMP-1 espressi in ng/ml, ± standard deviation (SD).

Lo stesso trend si è rilevato per OPN nelle pazienti prese in esame, affette da iperplasie o polipi dell'endometrio paragonate ai soggetti con carcinoma. I valori sono espressi come media ± deviazione standard (187 ± 59,6 pg/ml per i carcinomi; 121 ± 33,9 pg/ml per polipi e iperplasie, contro 46 ± 23,1 pg/ml rilevati nei soggetti controllo). Come già riportato dai dati della letteratura, i valori medi, se pur in un piccolo gruppo di donne

con carcinoma, sono significativamente più elevati rispetto a quelle con patologie benigne dell'utero ed ancora di più rispetto ai controlli (fig 3).

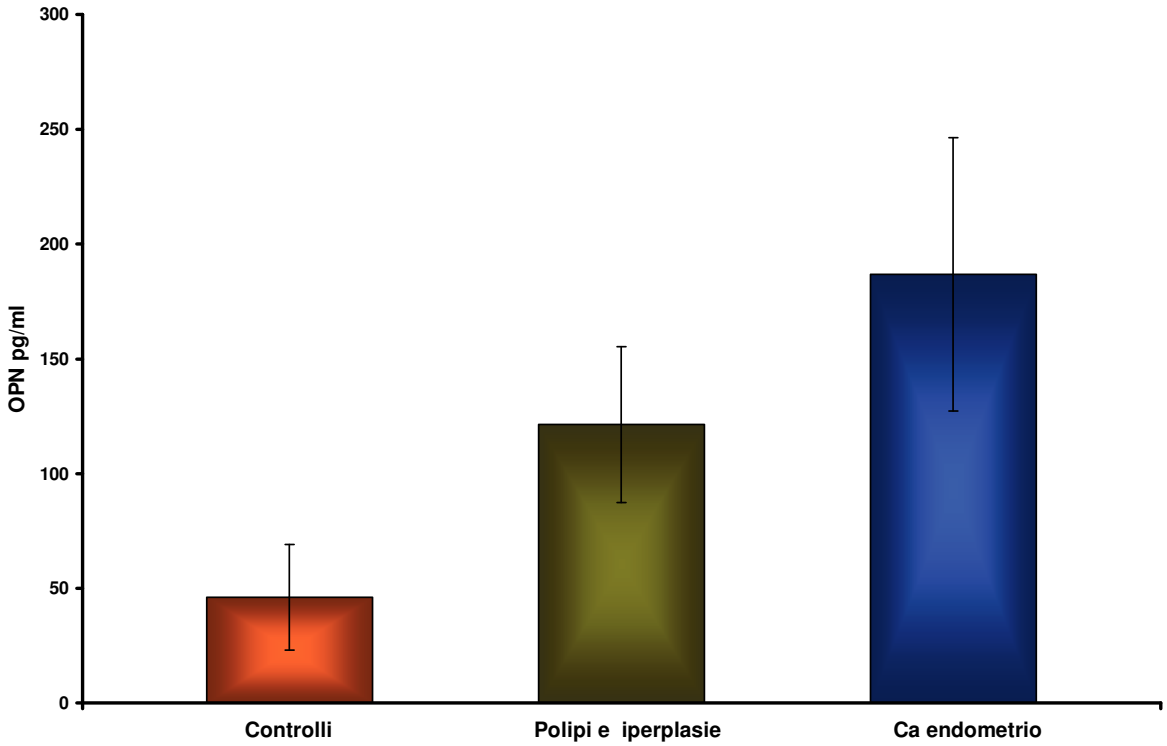



**Fig. 3** Valori medi dei livelli sierici di OPN, espressi in pg/ml, ± standard deviation (SD).

Le fig. 4,5,6 mostrano degli esempi di RT-PCR per MMP-9, TIMP-1 e OPN, e i relativi grafici mostrano i valori di mRNA per tali molecole normalizzati rispetto al corrispettivo gene *house-keeping*.

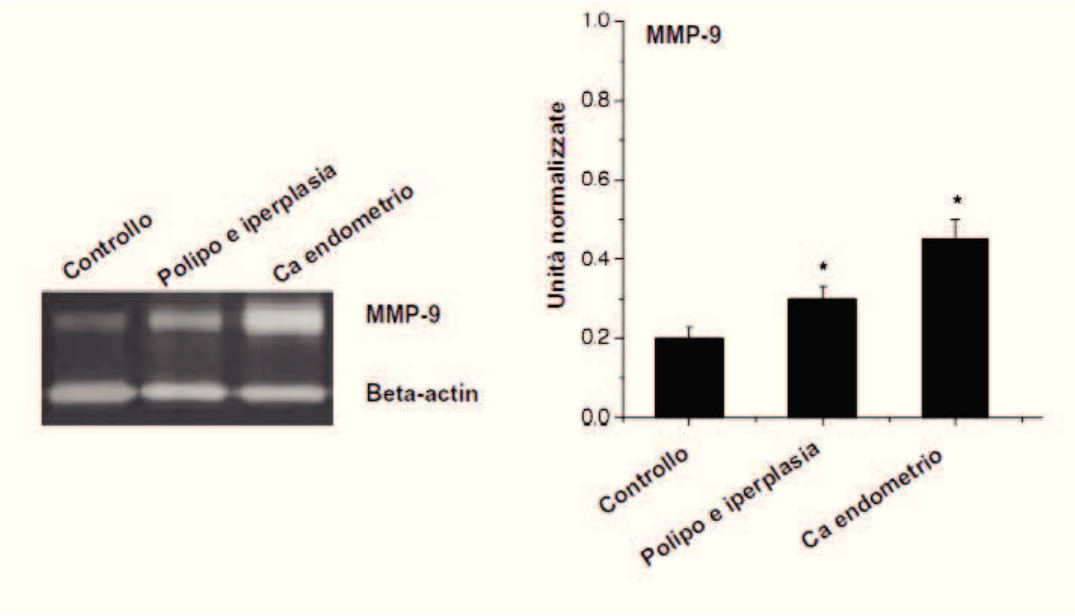



**Fig. 4** RT-PCR di MMP-9 e relativi valori medi normalizzati con il gene della β actina.

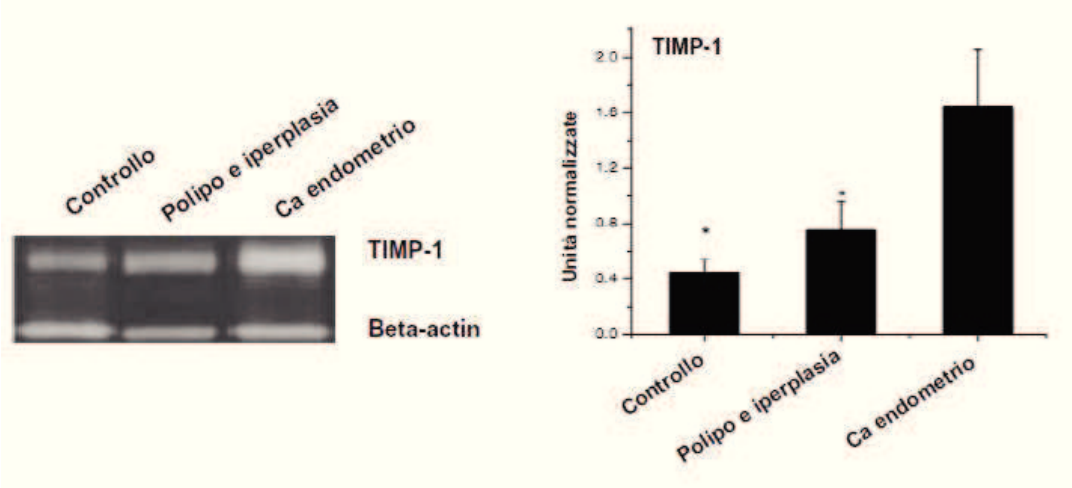



**Fig. 5** RT-PCR di TIMP-1 e relativi valori medi normalizzati con il gene della β actina.

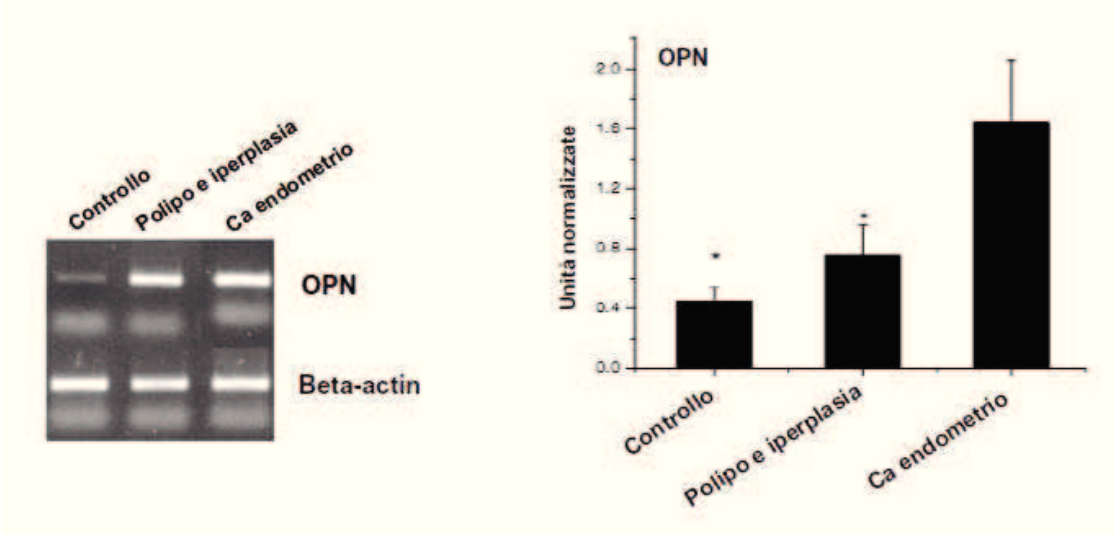



**Fig. 6** RT-PCR di OPN e relativi valori medi normalizzati con il gene della β actina.

Come si può notare, i valori medi rilevati dalle biopsie ottenute in corso di isteroscopia, riproducono lo stesso andamento dei livelli sierici dei tre parametri da noi considerati. Commentando i risultati ottenuti dalla nostra indagine, possiamo ribadire come i tre parametri da noi selezionati rappresentino dei buoni marcatori di neoplasia, nell'ambito delle combinazione di più molecole, atte a fornire dati utili alla diagnosi, alla prognosi e al monitoraggio della terapia.

Recentemente Weber (Weber GF, 2011) in una interessante *review*, sottolinea come OPN rappresenti un ottimo biomarcatore in diverse tipologie di cancro e riferisce come nell'endometrio sia stata studiata, in concomitanza con il CEACAM-1, molecola di adesione per recettore dell'Ag CEA correlato, e con la **ezrina** che risulta essere una

molecola dei segnali di motilità, interagendo entrambe con la β3-integrina (Kobel M, 2006). Una significativa correlazione di tali molecole è stata riscontrata anche nel *overall servival*.

La MMP-9 e il suo inibitore TIMP-1, come già ricordato, hanno mostrato lo stesso andamento di OPN, anche se i valori di TIMP-1 circolante, in accordo con i dati riferiti in letteratura, hanno mostrato una maggiore correlazione rispetto alla MMP-9.

Honkavuori, in un ampio studio che ha reclutato 93 donne, ha evidenziato alti livelli sierici di TIMP-1, in un gruppo di pazienti ad alto rischio, con una significatività elevata ($p < 0.018$) un *cut-off* di 536 ng/ml è stato utilizzato, per dividere le pazienti ad alto e basso rischio di recidiva e di metastasi (Honkavuori M, 2008). Quindi il dosaggio pre-operatorio, in accordo con i nostri risultati, si è mostrato molto indicativo come fattore prognostico. Come già ampiamente sottolineato in precedenza, la degradazione proteolitica della matrice extracellulare, rappresenta infatti, un aspetto fondamentale dello sviluppo della neoplasia e un evento chiave nella regolazione della proliferazione cellulare, nonché della invasività e del fenomeno metastatico.

La famiglia dei TIMPs, in particolare TIMP-1, inibitore non specifico di MMP-9, risulta avere un ruolo controverso in base alla tipologia di cancro. Nelle neoplasie della sfera femminile, in particolare in Ca ovarico, mammella ed endometrio, soprattutto nelle donne in età avanzata, il dosaggio pre-operatorio di TIMP-1 potrebbe risultare di grande aiuto nella scelta della terapia adiuvante primaria, ed essere ripetuto nel *follow-up* dei soggetti trattati con chemioterapia, dopo la exeresi chirurgica.

Negli ultimi anni, anche nel pianeta cancro, si sono affacciate altre molecole che sembrano essere disregolate durante lo sviluppo della neoplasia: i **micro-RNA**; in particolare Snowdon et al. (2011) hanno recentemente dimostrato un aumento della famiglia dei micro-RNA-200 in corso di carcinoma endometriale.

Come è noto, i micro-RNAs (miRNAs o miRs) sono piccole molecole di RNA (20-25 nucleotidi di lunghezza) non codificanti, che regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale; sono stati evidenziati sia nel mondo animale che vegetale e più recentemente anche nei virus. I miRNAs regolano processi chiave a livello cellulare come la proliferazione, l'apoptosi anche nelle cellule staminali normali e tumorali. Il loro meccanismo si attua attraverso il legame a RNA messaggero target, causando il clivaggio di mRNA, la repressione traslazionale e/o la distruzione di mRNA. Oggi si sa che il 50% di geni umani per miRNAs sono localizzati a livello dei siti fragili o in regioni del genoma note per essere disregolate dalla perdita, dalla amplificazione o dalla rottura in corso di neoplasia. Usando sofisticate tecniche di biologia molecolare, quali speciali *microarrays*, la disregolazione di miRNAs è stata evidenziata in molte tipologie di cancro nell'uomo incluse quelle della sfera genitale femminile. Questa alterazione è stata indicata come *tumor signature* in corso della proliferazione neoplastica.

Gli studi di Snowdon hanno mostrato una associazione di alti livelli dei componenti la famiglia miRNA-200 con un fenotipo meno aggressivo di Ca dell'endometrio; i risultati di tali ricerche contribuiscono ad indicare il profilo di espressione di miRNAs, come possibili indicatori e regolatori della tumorigenesi, la cui regolazione risulta influenzata e condizionata anche dai recettori per gli ormoni steroidei (estrogeni ed estradiolo).

E' noto che i carcinomi dell'endometrio che esprimono ERα tendono ad essere meno aggressivi rispetto alle forme tumorali che ne sono prive. Quindi è stata avanzata la suggestiva ipotesi che la natura meno aggressiva dei carcinomi ERα positivi potrebbe essere correlata anche alla *up-regulation* della famiglia dei miRNA-200 che mantiene un fenotipo epiteliale e resiste alla ulteriore malignità. I microRNAs sono quindi da considerare delle importanti molecole da affiancare ai più comuni biomarcatori, in uso

nella pratica clinica, anche se il loro esatto significato a tutt'oggi risulta da definire, data la loro enorme variabilità di comportamento nelle diverse forme di neoplasie.

# CONCLUSIONI

In base a quanto finora esposto, possiamo affermare che i parametri da noi presi in considerazione, MMP-9, TIMP-1 e OPN, rappresentano dei punti incontrovertibili nell'ampio mosaico del carcinoma dell'endometrio e delle più frequenti patologie benigne dell'utero.

Anche se la casistica da noi riportata abbisogna senza dubbio di essere ampliata, ci sentiamo di ribadire che, come riferito anche dai dati della letteratura, i risultati da noi ottenuti ci permettono di fornire nell'insieme, indicazioni prognostiche e preventive per una tipologia di neoplasia che non può essere certo identificata con il pap test, come avviene invece per il Ca della cervice. Da qui l'utilità di studiare più biomarcatori in contemporanea che, in modo non invasivo, possono fornire delle informazioni per distinguere, accanto alla sintomatologia clinica, le pazienti a basso ed alto rischio di neoplasia.

Senza dubbio in questi ultimi anni la letteratura scientifica sui biomarcatori tumorali è cresciuta in maniera smisurata, ma non così tanto rapidamente l'applicazione di marcatori validi nella pratica clinica. Pertanto, la ricerca in questo campo, merita di essere continuamente aggiornata ed ampliata, nonostante le ristrettezze economiche che caratterizzano il nostro quotidiano.

Richard Smith (Executive Director United Health Chronic Disease Initiative) recentemente, indicando con 5 giganti i mali che affliggono la società moderna (povertà, ignoranza, **malattia**, squallore, indolenza) sottolinea come sarebbe un errore combatterli separatamente, senza tenere in considerazione, nello sforzo della loro eradicazione, le interrelazioni che li potenziano.

Nei *goal* di questo millennio bisogna porre quindi l'eradicazione delle malattie, fra tutte la lotta contro il cancro, al centro dei nostri interessi di ricerca e nell'ambito dell'oncologia ginecologica, in particolare il Ca dell'endometrio merita l'approfondimento delle nostre conoscenze, per garantire il consolidamento di un efficace collaborazione fra i ricercatori di base e i clinici, operatori tutti di un *team* inscindibile, atto a migliorare la qualità di vita delle pazienti.

# BIBLIOGRAFIA

**Beeghly-Fadiel A**, Yong-Bing Xiang, Sandra L. Deming, Ji-Rong Lunga, Hong Wang Xu, Qiuyin Cai, Wei Zheng, and Xiao Ou Shu.No association between metalloproteinases (MMPs) -1,-3, and 7 SNP and risk of endometrial carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 18:1925-8. 2009

**Bhoopathi P**, Chetty C, Kunigal S, Vanamala SK, Rao JS, Lakka SS. Blockade of tumor growth due to matrix metalloproteinase-9 inhibition is mediated by sequential activation of β1-integrin, ERK, and NF-κB-dependent MMP-9 expression. J Biol Chem. 283:1545-52. 2008

**Bogusiewicz M**, Stryjecka-Zimmer M, Rechberger T. Activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 (MMP2 and MMP9) and content of their tissue inhibitors in endometrial cancer – a preliminary study.Gynecol Pol. 78:366-72. 2007

**Brooks R**, Kizer N, Nguyen L, Jaishuen A, Wanat Karolyn, Nugent E, Grigsby P, Allsworthh JE, Rader Janet S. Polymorphisms in MMP9 and SIPA1 are associated with increased risk of nodal metastases in early-stage cervical cancer. Gynecol Oncol. 116:539-43. 2010

**Castellano G**, Malaponte G, Mazzarino MC, Figini M, Marchese F, Gangemi P, Travali S, Stivala F, Canevari S, Libra M. Activation of the osteopontin/matrix metalloproteinase-9 pathway correlates with prostate cancer progression. Clin Cancer Res. 14:7470-80.2008

**Chabottaux V**, Noel A. Breast cancer progression: insights into multifaceted matrix metalloproteinases. Clin Exp Metastasis. 24:647-56. 2007

**Chantrain CF**, Shimada H, Jodele S, Groshen S, Ye W, Shalinsky DR, et al. Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment. Cancer Res. 64:1675-86. 2004

**Chaudhary AK**, Singh M, Bharti AC, Asotra K, Sundaram S and Mehrotra R. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck. Journal of Biomedical Science. 17:10. 2010

**Cho H**, Kang ES, Kim YT, Kim JH. Diagnostic and prognostic impact of osteopontin expression in endometrial cancer. Cancer Invest. 27:313-23. 2009

**Clark IM**, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR, The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. Int J Biochem Cell Biol. 40:1362-78. 2008

**Cotignola J**, Reva B, Mitra N, Ishill N, Chuai S, Patel A, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphism in patients with cutaneous malignant melanoma. BMC Med Genet. 8:10. 2007

**Denhardt DT** and Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. The FASEB Journal. 7:1475-82. 1993

**Desai B**, Rogers MJ, Chellaiah MA. Mechanisms of osteopontin and CD44 as metastatic principles in prostate cancer cells. Mol Cancer. 6:18. 2007

**Di Nezza LA**, Misajon A, Zhang J, Jobling T, Quinn MA, Ostör AG, Nie G, Lopata A, Salamonsen LA. Presence of active gelatinasse in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. Cancer 94:1466-75. 2002

**Dragutinović VV**, Izrael Živković L, Radovanović N. Relation of matrix metalloproteinase-9 to different stages of tumors in serum of gastric cancer. Dig Dis Sci. 54:1203-7. 2009

**Dragutinović VV**, Radonjić NV, Petronijevic ND, Tatic SB, Dimitrijević NS, Krivokapić ZV. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) in preoperative serum as independent prognostic markers in patients with colorectal cancer. Mol Chem Biochem. 355:173-8. 2011

**Du XL**, Jiang T, Sheng XG, Gao R, Li QS. Inhibition of osteopontin suppresses in vitro and in angiogenesis in endometrial cancer. Gynecol Oncol. 115:371-6. 2009

**Dunne AA**, Mandic R, Falkenberg S, Dalchow CV, Sesterhenn AM, Werner JA. RT-PCR expression profiling of matrix metalloproteinases and their specific inhibitors in cell lines and fresh biopsies of squamous cell carcinomas of the head and neck. In Vivo. 19:943-8. 2005

**El Houda Agueznay N**, Badoual C, Hans S, Gey A, Vingert B, Peyrard S, Quintin-Colonna F, Ravel P, Bruneval P, Roncelin S, Lelongt B, Bertoglio J, Fridman WH, Brasnu D and Tartour E. Soluble interleukin-2 receptor and metalloproteinase-9 expression in head and neck cancer: prognostic value and analysis of their relationships. Clin Exp Immunol. 150:114-23.2007

**El-Tanani MK**, Campbell FC, Kurisetty V, Jin D, McCann M, Rudland PS. The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. Cytokine & Growth Factor Reviews. 17: 463-74. 2006

**Fernandes T**, De Angelo-Andrade LA, Moraiss SS, Pinto GA, Chagas CA, Maria-Engler SS and Zeferino LC. Stromal cells play a role in cervical cancer progression mediated by MMP-2 protein. Eur J Gynaecol Oncol. 29:341-4. 2008

**Graesslin O**, Cortez A, Uzan C, Birembaut P, Quereux C, Darai E. Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expression. Int J Cancer Gyncol. 16:1911-7. 2006 (a)

**Graesslin O**, Cortez A, Fauvet R, Lorenzato M, Birembaut P, and Daraï E. Metaloproteinase-2, -7 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1and -2 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium: a clinical-pathological correlation study. Ann Oncol. 17:637-45. 2006 (b)

**Hicks ML**, Piver MS, Puretz JL, Hempling RE, Baker TR, Mcauley M, Walsh DL. Survival in patients with paraaortic lymph node metastases from endometrial adenocarcinoma clinically limited to the uterus. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 26:607-11. 1993

**Hoikkala S**, Paakko P, Soini Y, Makitaro R, Kinnula V, Turpenniemi-Hujanen T. Tissue MMP-2/TIMP-2 complex are better prognostic factors than serum MMP-2, MMP-9 or TIMP-1 in stage I-III lung carcinoma. Cancer Lett. 236:125-32. 2005

**Hojilla CV**, Wood GA, Khokha R, Inflammation and breast cancer. Metalloproteinases as common effectors of inflammation and extracellular matrix breakdown in breast cancer. Breast Cancer Res. 10:205-13. 2008

**Honkavuori M**, Talvensaari Mattila-A, Soini Y, Turpeenniemi Hujanen-T, Santala M. MMP-2 expression associates with CA 125 and clinical course in endometrial carcinoma. Gynecol Oncol. 104:217-21. 2007

**Honkavuori M**, Talvensaari Mattila-A, Puistola U, Turpeenniemi Hujanen-T, Santala M. High serum TIMP-1 is associated with adverse prognosis in endometrial carcinoma. Anticancer Research. 28:2715-9. 2008

**Hu Z**, Huo X, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y, et al. Functional polymorphism of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. Clin Cancer Res. 11:5433-9. 2005

**John A**, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. Pathol Oncol Res. 7(1):14-23. 2001value and analysis of their relationships. British Society for Immunology, Clin Exp Immunol. 150:114-23. 2007

**Libra M**, Scalisi A, Vella N, Clementi S, Sorio R, Stivala F, Spandidos DA, Mazzarino C. Uterine cervical carcinoma:role of matrix metalloproteinases (Review). Int J Oncol. 34:897-903. 2009

**Lee SO**, Jeong YJ, Yu MH, Lee JW, Hwangbo MH, Kim CH et al. Wogonin suppresses TNF-α-induced MMP-9 expression by bloking the NF-κB activation via MAPK signaling pathways in human aortic smooth muscle cells. Biophys Res Commun. 351:118-25. 2006

**Lee SO**, Jeong YJ, Kim MH, Kim CH, Lee IS, et al. Suppression of PMA-induced tumor cell invasion by capillarisin via the inhibition of NF-κB-dependent MMP-9 expression. Biochem Biophys Res Commun. 366:1019-24. 2008

**Myers DL**. The role of osteopontin in vascular remodeling. The University of Maine. May. 2004

**Nagase H**, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res. 69:562-73. 2006

**Nakamura T**, Kuwai T, Kim JS, Fidler IJ. Stromal metalloproteinase-9 is essential to angiogenesis and progressive growth of orthotopic human pancreatic cancer in parabiont nude mice. Neoplasia. 9:979-86. 2007

**O-Charoenrat P**, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors Correlates With Invasion and Metastasis in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 127:813-20. 2001

**Oh JH**, Kim JH, Ahn HJ, Yoon JH, Yoo SC, Choi DS, Lee, Ryu HS, Min CK. Syndecan-1 enhances the endometrial cancer invasion by modulating matrix metalloproteinase-9 expression through nuclear factor kB. Gynecol Oncol. 114:509-15. 2009

**Pazolli E**, Xianmin Luo, Sarah Brehm, Kelly Carbery, Jae Chung Jun, Prima Julie, Jeason Doherty, Shadmehr Demehri, Lorena Salavaggione, David Piwnica-Worms, Sheila A. Stewart. Senescent Stromal-derived osteopontin promotes preneoplastic cell growth. Cancer Res. 69:1230-9. 2009

**Piura B**, Rabinovich, Huleihel M. Matrix metalloproteinase and their tissue inhibitors in malignancies of the female genital tract. Harefuah. 142:786-91, 804. 2003

**Karahan N**, Güney M, Baspinar S, Oral B, Kapucuoglu N, Mungan T. Expression of gelatinase (MMP-2 and -9) and cyclooxygenase-2 (cox-2) in endometrial carcinoma. Eur J Gynecol Oncol. 28:184-8. 2007

**Katsuhiko Naruse**, Gendie E. Lash, Barbara Innes A, Harry A. Otun, Roger Searle F, Stephen C. Robson, Judith N. Bulmer. Localization of metalloproteinase (MMP-2), MMP9 and tissue inhitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy. Hum Reprod. 24:553-61. 2009

**Khodavirdi AC**, Song Z, Yang S et al. Increased expression of osteopontin contributes to the progression of prostate cancer. Cancer Res. 66:883-8. 2006

**Kobel M** et al. Ezrin expression is related to poor prognosis in FIGO stage I endometrioid carcinoma. Mol. Pathol. 19: 581-7. 2006

**Ramankulov A**, Lein M, Kristiansen G, Loening SA, Jung K. Plasma osteopontin in comparison with bone markers as indicator of bone metastasis and survival outcome in patiens with prostate cancer. Prostate. 67:330-40. 2007

**Rangaswami H**, Bulbule A, Kundu GC. JNK1 differentially regulates osteopontin-induced nuclear factor-inducing kinase/MEKK1-dependent activating protein-1-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. J Biol Chem. 280:19381-92. 2005

**Rangaswami H**, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. Trends Cell Biol. 16:79-87. 2006

**Rauvala M**, Aglund K, Puistola U, Turpeenniemi-Hujanen T, Horvath G, Willen R and Stendahl U. Matrix metalloproteinases-2 and -9 in cervical cancer: different roles in tumor progression . Int J Gynecol Cancer. 16:1297-302. 2006

**Roomi MW**, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. Distict Patterns of matrix metalloproteinase 2 and 9 expression in normal human cell lines. Oncol Rep. 21:821-6. 2009

**Ruokolainen H**, Paakko P, Turpeenniemi Hujanen-T. Serum matrix metalloproteinase-9 in Head and neck squamous cell carcinoma is a prognostic marker. Int J Cancer. 116:422-7. 2005

**Shaco-Levy R**, Sharabi S, Benharroch D, Piura B, Sion-Vardy N. Matrix metalloproteinases 2 and 9, E-cadherin, and β-catenin expression in endometriosis, low-grade endometrial carcinoma and non-neoplastic eutopic endometrium. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 139:226-32. 2008

**Snowdon** et al. Micro-RNA-200 family is upregulated in endometrial carcinoma. Plos-one 6,8, e22828. 2011

**Somiari SB**, Somiari RI, Heckman CM, Olsen CH, Jordan RM, Russell SJ, Shriver CD. Circulationg MMP2 and MMP9 in breast cancer-potential role in classification of patients into low risk, high risk, benign disease and breast cancer categories. Int J Cancer 119:1403-11. 2006 (a)

**Somiari SB**, Shriver CD, Heckman C, Olsen C, Hu H, Jordan R, Arciero C, Russell S, Garguilo G, Hooke J, Somiari RI. Plasma concentration and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with breast disease, breast cancer and risk of developing breast cancer. Cancer Lett. 233:98-107. 2006 (b)

**Sternlicht MD** and Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annual Rev Cell Dev Biol. 17:463-516. 2001

**Takafuji V**, Forgues M, Unsworth E, Goldsmith P, Wang XW. An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma. Oncogene. 26:6361-71. 2007

**Talvensaari-Mattila A**, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase 9 in the uterine cervix during tumor progression. Int J Gynaecol Obstet. 92:83-4. 2006

**Tang Y**, Zhu J, Chen L, Zhang S, Lin J. Associations of matrix metalloproteinase-9 protein polymorphisms with lymph node metastasis but not invasion of gastric cancer. Clin Cancer Res. 14:2870-7. 2008

**Tomlins SA**, Mehra R, Rhodes DR et al. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. Nat Genet. 39:41-51. 2007

**Vihinen P** and Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. Int. J. Cancer. 99: 157-66. 2002

**Wai PY** and Kuo PC. The Role of Osteopontin in Tumor Metastasis. Journal of Surgical Research. 121: 228–41. 2004

**Wang FQ**, Ariztia EV, Boyd LR, Horton FR, Smicun Y, Hetherington JA, Smith PJ, Fishman DA. Lysophosphatidic Acid (LPA) effects on endometrial carcinoma in vitro proliferation, invasion, and matrix metalloproteinase activity. Gynecol Oncol. 117:88-95. 2010

**Wang KX**, Denhardt DT. Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses. Cytokine & Growth Factor Reviews. 19: 333-45. 2008

**Wang PH**, Ko JL, Tsai HT, Yang SF, Han CP, Li LY and Chen GD. Clinical significance of matrix metalloproteinase-2 in cancer of uterine cervix: a semiquantitative study of immunoreactivities using tissue array. Gynecol Oncol 108:533-42. 2008

**Weber GF**, Lett GS, Haubein NC. Osteopontin is a marker for cancer aggressiveness and patient survival. British Journal of Cancer. 103:861-9. 2010 (a)

**Weber GF**, G. Scott Lett, Ned C. Haubein. Categorical meta-analysis of osteopontin as a clinical cancer marker. Oncology Reports. 25:433-41. 2010 (b)

**Weber GF** et al. Cancer genomics and the cancer biomarker OPN: combination with other markers. Proteomics. 8:263-88. 2011

**Xie Y**, Sakatsume M, Nishi S, Narita I, Arakawa M and Gejyo F. Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. Kidney International. 60:1645-57. 2001

**Yasunori Hashiguchi**, Hiroshi Tsuda, Chrina A. Bandera, Sadako Nishimura, Takeshi Inoue, Naoki Kawamura, Ross S. Berkwowitz and Samuel C. Mork. Comparison of osteopontin expression in endometrioid endometrial cancer and ovarian endometrioid cancer. Medical oncology. 23:205-12. 2006

**Yang SF**, Wang PH, Lin LY, Ko JL, Chen GD, Yang JS, Lee HS and Hsieh YS. A significant elevation of plasma level of matrix metalloproteinase-9 in patiens with high-grade intraepithelial neoplasia and early squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Reprod Sci. 14:710-8. 2008

**Yi YC**, Chou PT, Chen LY, Kuo WH, Ho ES, Han CP, Yang SF. Matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) polymorphism is a risk factor for endometrial cancer susceptibility. Clin Chem Lab Med. 48:337-44. 2010