

# CAPITOLO 1

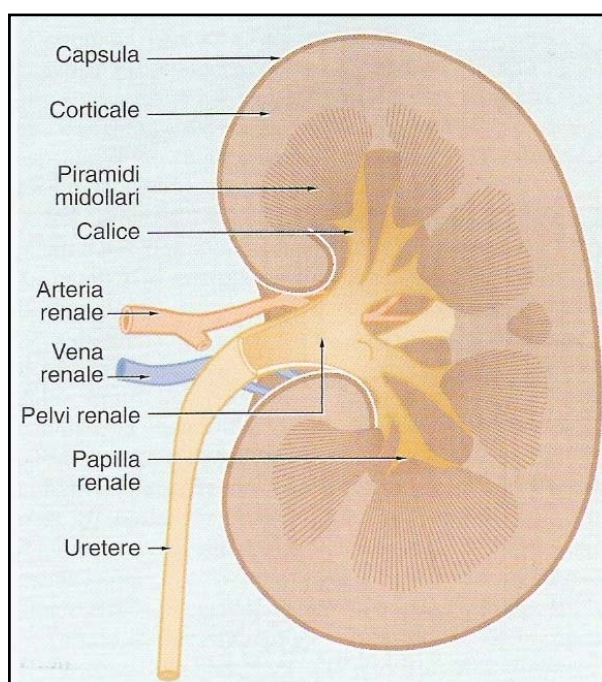
## INTRODUZIONE

### 1.1 IL RENE: STRUTTURA E FUNZIONI

I reni sono organi pari con forma a fagiolo situati nella cavità retroperitoneale. Di colorito rosso bruno e di consistenza abbastanza dura, i reni hanno un peso di circa 150 g nell'uomo adulto, con una lunghezza media è di 12 cm e una larghezza di 6 cm. La superficie del rene è liscia e regolare, ma può presentare solchi che delimitano territori corrispondenti ai singoli lobi.

Il flusso sanguigno renale è assicurato dalle arterie renali, che sono rami dell'aorta addominale; il sangue refluo è, invece, drenato nella vena cava inferiore attraverso le vene renali. Circa il 25% della gittata cardiaca raggiunge i reni <sup>1</sup>.

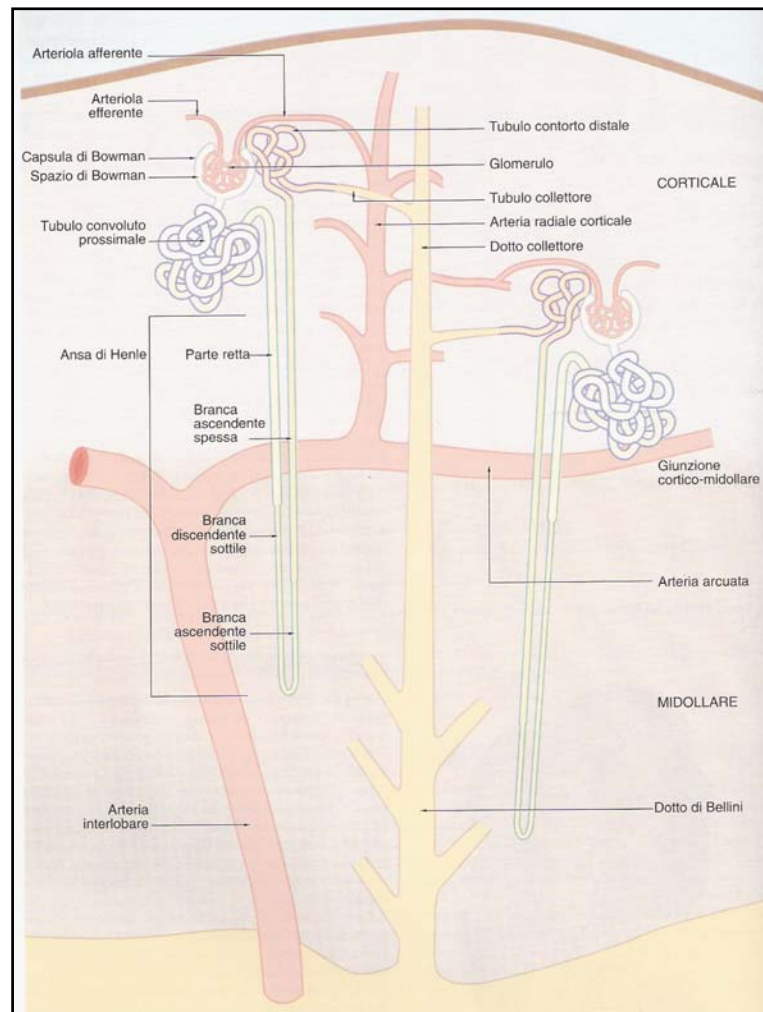
Il rene è un organo molto complesso a livello anatomico, che consiste di differenti cellule altamente specializzate a formare una struttura ben organizzata (Figura 1).



**Figura 1.** Il rene (Immagine tratta da Wheeler. Istologia e anatomia microscopica, a cura di Young B, Heath JW. Casa Editrice Ambrosiana).

L'unità funzionale del rene è chiamata *nefrone* (in ogni rene si trovano approssimativamente 1 – 1,5 milioni di nefroni); ogni nefrone è costituito da un corpuscolo renale, a sua volta composto da un glomerulo e da un'espansione a fondo cieco del tubo urinifero che prende il nome di capsula di Bowman, e da un lungo tubulo renale. Quest'ultimo ha inizio in corrispondenza del polo urinario ed è

suddiviso in diversi dotti - tubulo prossimale, ansa di Henle, tubulo distale, dotto collettore – ciascuno caratterizzato da una tipica struttura cellulare e specifica funzione renale (Figura 2).



**Figura 2.** Organizzazione del nefrone, del sistema collettore e della vascolarizzazione renale (Immagine tratta da Wheater. Istologia e anatomia microscopica, a cura di Young B, Heath JW. Casa Editrice Ambrosiana).

I nefroni sono posizionati strettamente insieme a formare il parenchima renale, che può essere diviso in due regioni. La porzione più esterna del rene è chiamata *corticale*: essa contiene i corpuscoli renali e i tubuli renali, ad eccezione di una parte di essi che scende all'interno della midollare. Dunque la sezione più interna, detta *midollare*, è costituita dalle anse di Henle e dai dotti collettori. Nella midollare è possibile distinguere da sette a dieci formazioni coniche, chiamate *piramidi renali*, la cui base continua nella sostanza corticale mentre l'apice, o papilla renale, è rivolta internamente. Le piramidi renali si estendono nella pelvi renale e appaiono di aspetto striato, essendo percorse assialmente dai tubuli collettori e dai dotti papillari. In ogni

rene sono presenti tipicamente da cinque a quattordici lobi renali, ciascuno dei quali è formato da una piramide circondata, eccetto che a livello della papilla, da uno strato di tessuto corticale. La midollare renale è iperosmolare rispetto alle altre parti del rene. Le strutture funzionali che la costituiscono adempiono alla funzione emuntoria renale; la midollare è infatti importante per la concentrazione dell'urina, successivamente convogliata nei calici e da questi nel bacinetto per raggiungere la vescica dopo aver percorso gli ureteri. Il processo di formazione dell'urina ha inizio nel glomerulo, che è la porzione vascolare del corpuscolo renale ed è costituito da capillari arteriosi racchiusi tra arteriola afferente ed efferente. I capillari sono rivestiti da un endotelio altamente fenestrato che permette l'ultrafiltrazione del plasma; nella capsula di Bowman si raccoglie l'ultrafiltrato glomerulare o pre-urina, circa 180 litri al giorno, che successivamente abbandona la capsula stessa per entrare nel tubulo renale dove viene modificato mediante esposizione ai diversi segmenti epiteliali specializzati con differenti funzioni di trasporto. Il processo mediante il quale il materiale filtrato viene riportato dal lume del nefrone al sangue è detto riassorbimento, mentre il movimento di specifiche molecole in direzione contraria è chiamato secrezione. Il tubulo contorto prossimale (TCP), che è localizzato interamente nella corteccia renale, assorbe circa due terzi del filtrato glomerulare. Il fluido rimanente alla fine del TCP entra nell'ansa di Henle, situata nella midollare renale e comprendente una parte rettilinea discendente, il segmento ad "U" e una parte rettilinea ascendente, dove vengono riassorbiti elettroliti ma non acqua (riassorbimento isoosmotico di acqua). A questo punto il 90% del liquido entrato nel nefrone è stato ormai riassorbito. L'ansa di Henle termina nella macula densa, che si trova a contatto con l'arteriola efferente e che insieme alle cellule iuxtaglomerulari (elementi semiepiteliali situati nella media dell'arteriola afferente) costituisce l'apparato iuxtaglomerulare che ha la funzione di regolare la pressione di filtrazione glomerulare. Ritornando nella corteccia, il filtrato glomerulare entra quindi nel tubulo contorto distale ed infine nel dotto collettore, che percorre nuovamente la midollare per convogliare l'urina verso le papille renali dove viene riversata nella pelvi renale. Nel tubulo distale e nel dotto collettore si ha la regolazione fine del bilancio idrosalino sotto controllo di diversi ormoni; è proprio qui che viene regolata la concentrazione finale delle urine.

Dunque il sistema tubulare renale svolge principalmente la funzione di riassorbimento, restituendo al sistema circolatorio i materiali utili e gran parte dell'acqua e trattenendo le scorie da eliminare; ha il compito di produrre l'urina finale,

che dalla pelvi raggiunge la vescica spostandosi lungo gli ureteri per effetto di contrazioni muscolari ritmiche periodiche. La vescica si riempie di urina fino a quando viene rilasciata nell'ambiente esterno attraverso l'uretra. Il volume medio di urina prodotta dai reni è circa 1,5 litri al giorno; questo significa che più del 99% del liquido che entra nei nefroni viene riportato nel sangue anziché essere escreto.

La funzione dei reni nell'organismo umano è quindi quella di regolazione ed escrezione; mediante l'escrezione essi regolano la concentrazione e la quantità dei liquidi corporei e sono fra i principali responsabili dell'omeostasi corporea. In dettaglio, le funzioni possono essere così suddivise <sup>2</sup>:

1. Mantenimento della composizione corporea. Regolazione dell'osmolarità e del volume dei liquidi nell'organismo per mantenere il normale volume cellulare nei tessuti e per un corretto funzionamento dell'apparato cardiocircolatorio. Controllo del contenuto elettrolitico e sua acidità mediante variazione nell'escrezione urinaria di acqua e ioni inorganici. Gli elettroliti regolati sono principalmente sodio, potassio, cloruro, calcio, magnesio e fosfato.
2. Escrezione di cataboliti metabolici non più utili (es. urea, acido urico, creatinina) e sostanze estranee dannose (es. tossine, farmaci).
3. Produzione e secrezione di enzimi ed ormoni.
  - Renina, enzima proteolitico secreto dalle cellule iuxtaglomerulari responsabile dell'attivazione del processo che trasforma l'angiotensinogeno in angiotensina. L'angiotensina è un potente vasocostrittore e contribuisce in maniera significativa al controllo pressorio ed idroelettrolitico a livello renale.
  - Eritropoietina, glicoproteina prodotta dalle cellule interstiziali della corteccia renale stimola la maturazione degli eritrociti all'interno delle cellule del midollo osseo.
  - Calcitriolo o 1,25-diidrossicolecalciferolo, forma attiva della vitamina D3, è un ormone steroideo sintetizzato dalle cellule del tubulo prossimale renale che riveste un ruolo fondamentale nella regolazione dell'assorbimento di calcio e fosfato.

Numerose funzioni corporee procedono correttamente solo quando la composizione ed il volume dei fluidi sono mantenuti entro una determinata soglia fisiologica. Il ruolo essenziale dei reni è quindi la correzione di variazioni nella composizione corporea dovute ad assunzione di cibi, metabolismo, fattori ambientali ed esercizio fisico.

Le affezioni primarie del rene sono molto complesse e possono essere suddivise sulla base della componente morfologica colpita: glomeruli, tubuli, interstizio e vasi sanguigni. Le manifestazioni cliniche delle malattie renali possono essere raggruppate in numerose sindromi ben definite, tra cui ad esempio l'*insufficienza renale cronica*, caratterizzata da segni clinici tipici di una uremia prolungata, costituisce lo stadio terminale di tutte le malattie croniche renali. Oltre a queste sindromi, è importante ricordare anche i *tumori renali* che rappresentano specifiche alterazioni anatomiche.

## **1.2 I TUMORI DEL RENE**

### **1.2.1 IL TUMORE**

Il termine *tumore*, che letteralmente significa tumefazione, in origine era associato alla presenza di un rigonfiamento causato da processi patologici di varia natura (es. edemi, emorragie, infiammazioni) o dall'aggregazione di cellule trasformate sul sito anatomico di origine. Il termine *neoplasia*, che letteralmente significa nuova formazione, è quindi un sinonimo di tumore ed indica, più nello specifico, il contenuto cellulare della massa che è costituito da cellule proliferanti. Quest'ultime sono elementi anomali, che non rispondono più ai meccanismi fisiologici che regolano i processi di proliferazione e di differenziazione cellulare, oltre che di accrescimento dei tessuti, a seguito di danni a livello genetico. Tali irregolarità che generano una incontrollata proliferazione cellulare sono il risultato di una deviazione del profilo dell'espressione genica, e di conseguenza dell'espressione proteica, delle cellule neoplastiche rispetto a quello delle cellule progenitrici sane.

La neoplasia può avere origine benigna o maligna a seconda delle caratteristiche delle cellule neoplastiche. In particolare si definisce *cancro* (dal latino cancer) un tumore che presenta caratteristiche infiltranti (infiltrazione in organi distali rispetto al sito di origine) e un alto tasso di recidiva molto spesso anche dopo asportazione chirurgica. Dunque le cellule neoplastiche in un tumore maligno possono staccarsi dalla massa principale, invadere i tessuti vicini e, attraverso la circolazione sanguigna o linfatica, raggiungere altri organi vitali (processo che prende il nome di metastatizzazione) compromettendo ulteriormente la situazione clinica del paziente. Con il termine cancro, in generale, viene indicato un gruppo eterogeneo di malattie caratterizzate da una crescita e diffusione incontrollata di cellule anomale.

Tutti i tumori, benigni e maligni, sono costituiti da due componenti: il parenchima, cioè le cellule neoplastiche proliferanti, e lo stroma di supporto, formato da tessuto connettivo e da vasi sanguigni <sup>3</sup>. Un adeguato apporto di sangue è indispensabile per la crescita neoplastica.

I tumori benigni derivano dalla proliferazione incontrollata di cellule che vanno incontro a mitosi normali dal punto di vista della duplicazione e della segregazione del genoma; queste cellule mantengono la maggior parte delle caratteristiche morfologiche e funzionali dei corrispettivi tessuti normali. Questa classe di tumori provoca un danno locale dovuto alla compressione dei tessuti vicini e, nel caso colpisca una ghiandola, un'iperfunzionalità endocrina ed una volta asportati totalmente non recidivano. I tumori benigni sono generalmente identificati con il tipo di cellula da cui la massa tumorale ha avuto origine, seguito dal suffisso “-oma”. I tumori delle cellule mesenchimali seguono per lo più questa regola, mentre i tumori benigni di origine epiteliale vengono classificati in base alla cellula di origine oppure all'architettura microscopica/macroscopica. Il termine *adenoma* indica una neoplasia epiteliale benigna che forma aspetti ghiandolari, così come un tumore che deriva da ghiandole ma che non presenta tali caratteristiche. Le neoplasie benigne epiteliali che producono proiezioni digitiformi o verrucoidi sono chiamate *papillomi*, mentre quelle che formano grosse masse cistiche sono denominate *cistoadenomi*.

I tumori maligni sono costituiti dalla proliferazione di cellule che vanno incontro a mitosi “anormali” dal punto di vista della replicazione e della segregazione del genoma; le cellule risultano quindi indifferenziate e viene persa la somiglianza con il tessuto di origine sia dal punto di vista morfologico che funzionale. Questa classe di tumori cresce mediante un meccanismo infiltrativo/invasivo; le infiltrazioni possono interessare anche tessuti più profondi, dando vita a metastasi per via ematica e/o linfatica, ed è per questo motivo che se asportati possono comunque recidivare. I tumori maligni che insorgono nei tessuti mesenchimali sono chiamati *sarcomi* (dal greco sar), poiché presentano una scarsa componente stromale e hanno consistenza carnosa. Le neoplasie maligne che originano, invece, dalle cellule epiteliali derivanti da ciascuno dei tre strati germinativi sono dette *carcinomi*; quest'ultimi possono ulteriormente essere classificati in *adenocarcinoma*, se sono di aspetto ghiandolare a livello microscopico, o *carcinomi a cellule squamose*, se sono caratterizzati da cellule di tipo squamoso derivanti da un epitelio pavimentoso stratificato. Generalmente viene specificato anche l'organo di origine del tumore (es. adenocarcinoma a cellule renali, adenocarcinoma del colon). Nella maggior parte

delle neoplasie, sia benigne che maligne, le cellule parenchimali derivano tutte da una singola cellula e presentano quindi una forte somiglianza tra loro; a volte, può tuttavia accadere che vi sia una proliferazione contemporanea di due o più tipi cellulari diversi (per es. cellule epiteliali e cellule connettivali) e si parla in questo caso di *tumori misti* (la forma più frequente e che meglio rappresentativa di questa neoplasia è il tumore misto delle ghiandole salivari). Generalmente tutte queste neoplasie, inclusi i tumori misti, sono costituite da cellule derivanti da un singolo foglietto germinativo; i *teratomi*, invece, sono composti da diversi tipi di cellule parenchimali che hanno preso origine da più foglietti germinativi.

Nella maggioranza dei casi esistono dei criteri che consentono di differenziare un tumore benigno da un tumore maligno, e di predire approssimativamente quello che sarà il decorso della neoplasia; i criteri su cui si basa tale distinzione possono essere raggruppati in:

1. differenziamento e anaplasia
2. velocità di accrescimento
3. invasività locale
4. metastasi

Il differenziamento indica il grado di somiglianza tra le cellule parenchimali neoplastiche e le corrispondenti cellule normali sia per l'aspetto morfologico che funzionale. I tumori ben differenziati sono costituiti da cellule molto simili agli elementi maturi normali del tessuto da cui la neoplasia ha avuto origine, mentre i tumori scarsamente differenziati o indifferenziati sono caratterizzati da cellule immature e non specializzate. In generale tutti i tumori benigni sono ben differenziati. Le neoplasie maligne, invece, possono presentarsi in entrambe le forme, differenziata e non differenziata; i tumori maligni costituiti da cellule indifferenziate sono definiti anaplastici e la mancanza di differenziamento o anaplasia rappresenta un indice di trasformazione maligna. Le neoplasie maligne ben differenziate derivano dalla maturazione o dalla specializzazione di cellule indifferenziate, mentre quelle non differenziate originano dalla proliferazione senza maturazione di cellule trasformate. L'anaplasia è caratterizzata da una serie di modificazioni morfologiche e funzionali; sia le cellule che i corrispondenti nuclei mostrano un pleomorfismo, cioè variazioni nelle dimensioni e forma (dimensioni irregolari, volumi differenti e più nucleoli). In generale, tanto più rapida è la crescita di un tumore e maggiore il suo grado di anaplasia, tanto meno è probabile che esso conservi un'attività funzionale specializzata.

Solitamente, la maggior parte dei tumori benigni cresce in maniera lenta nell'arco di diversi anni, mentre le neoplasie maligne crescono molto più rapidamente fino a metastatizzare nell'organismo. Da sottolineare comunque che la velocità di crescita per entrambe le tipologie di tumore può non essere costante nel tempo; numerosi fattori possono influenzare l'accrescimento, quali ad esempio la dipendenza ormonale o l'adeguato apporto sanguigno. Comunque, la velocità di crescita è correlata al livello di differenziamento del tumore e, quindi, la maggior parte dei tumori maligni cresce più velocemente rispetto ai tumori benigni.

Quasi tutti i tumori benigni crescono e si espandono come masse ben localizzate nel sito di origine, non hanno la capacità di infiltrare, invadere o metastatizzare altri siti dell'organismo, come invece accade per le neoplasie maligne. Crescendo lentamente, i tumori benigni sviluppano una capsula fibrosa (rivestimento di tessuto connettivale) che li separa dal tessuto circostante che li ospita; tale capsula consente di distinguere facilmente la massa tumorale, facilmente palpabile, che può quindi essere enucleata chirurgicamente. La crescita delle neoplasie maligne è, invece, caratterizzata da una progressiva infiltrazione, invasione e distruzione del tessuto circostante; a causa di questa capacità invasiva, la resezione chirurgica risulta difficile ed è quindi molto spesso necessario rimuovere una quantità notevole di tessuto apparentemente normale accanto al tumore.

Le metastasi identificano chiaramente un tumore maligno; la gran parte dei tumori maligni si accresce, invade i tessuti circostanti di altri organi e dà origine a nuove formazioni neoplastiche, separate e distanti dal tumore primario. Questo processo è noto come metastatizzazione, e le formazioni neoplastiche secondarie sono dette metastasi. È a seguito dell'accumulo di mutazioni genetiche che la cellula, oltre a crescere in maniera incontrollata e a sopprimere i meccanismi di apoptosi, acquista la capacità di staccarsi dalla massa iniziale, penetrare nei vasi sanguigni o linfatici e stabilirsi in altri tessuti, anche molto lontani da quelli di origine. In generale tutti i cancri possono metastatizzare, mentre le neoplasie benigne non danno metastasi. Importante sottolineare che la diffusione di metastasi nell'organismo riduce fortemente la possibilità di cura della neoplasia. La colonizzazione dei tumori maligni può avvenire attraverso diverse vie:

- impianto diretto in cavità e superfici dell'organismo
- disseminazione per via linfatica
- disseminazione per via ematica



Il trasporto di cellule tumorali attraverso i vasi linfatici rappresenta la via di diffusione iniziale più frequente dei carcinomi; tale disseminazione delle metastasi ai linfonodi segue le normali vie di drenaggio linfatico. La diffusione per via ematica è, invece, tipica dei sarcomi; le vene vengono penetrate più facilmente rispetto alle arterie dalle cellule neoplastiche, le quali vengono trasportate dal sangue seguendo il flusso ematico che drena il sito in cui è localizzata la neoplasia (dunque il fegato e i polmoni sono gli organi più frequentemente interessati). Alcune neoplasie maligne hanno una particolare predisposizione all'invasione venosa; ad esempio, i carcinomi renali sono soliti invadere la vena renale e i corrispettivi rami, crescendo fino alla vena cava inferiore, dalla quale a volte raggiungono la parete destra del cuore.

Alla base del processo di tumorigenesi vi è un accumulo di mutazioni genetiche non letali, che possono essere acquisite per l'azione di agenti ambientali quali sostanze chimiche, radiazioni e virus oppure possono essere ereditate nella linea germinale; queste mutazioni provocano una deviazione del profilo dell'espressione genica delle cellule neoplastiche rispetto a quello delle cellule progenitrici sane. I principali bersagli del danno genetico sono tre classi di geni che normalmente controllano e regolano il ciclo cellulare, la segregazione genica e la riparazione del danno al DNA:

1. proto-oncogeni e oncogeni
2. geni oncosoppressori
3. geni che regolano la morte cellulare programmata o apoptosi
4. geni che regolano i processi di riparazione dei danni al DNA.

Gli oncogeni, o geni che provocano il cancro, derivano dai proto-oncogeni, ossia geni che favoriscono i processi di crescita e di differenziamento. I proto-oncogeni possono acquisire potere trasformante per trasduzione retrovirale o per l'azione di una moltitudine di fattori che ne alterano il comportamento, convertendoli in oncogeni cellulari attivati. Gli oncogeni codificano per proteine, chiamate oncoproteine, che sono prive di fondamentali elementi regolatori e sono prodotte nelle cellule tumorali indipendentemente da fattori di crescita o altri segnali esterni. Gli oncosoppressori, invece, regolano la normale crescita cellulare ponendo freno alla proliferazione; la loro inattivazione funzionale libera i meccanismi di crescita incontrollata e atipica delle neoplasie. Uno squilibrio tra l'attivazione degli oncogeni e l'inattivazione degli oncosoppressori è alla base della tumorigenesi. Anche geni che prevengono o inducono l'apoptosi rivestono un ruolo importante nel bilancio della crescita tumorale. Inoltre, le cellule normali presentano la capacità fisiologica di riparare i danni al DNA e di prevenire quindi l'insorgenza di mutazioni genetiche che possono alterare la

crescita/morte cellulare; oltre ai possibili danni causati da fattori ambientali, il DNA è soggetto anche a modificazioni dovute ad errori che si verificano spontaneamente durante i processi di replicazione. Quando tali errori non vengono riparati, la cellula inizia la sua trasformazione neoplastica. I geni che regolano la riparazione del DNA non sono coinvolti direttamente nello sviluppo dei tumori, ma un loro deficit promuove l'insorgenza di mutazioni in altri geni durante il normale processo di duplicazione cellulare.

Al fine di poter definire con maggior precisione la gravità clinica di un tumore, sono stati elaborati negli anni dei sistemi che descrivono il livello di differenziamento (grado) e l'estensione del tumore (stadio). Il *grado* di una neoplasia maligna si riferisce al livello di differenziamento delle cellule tumorali e al tasso di crescita (indice mitotico); il sistema più utilizzato per classificare l'aggressività del cancro del rene è quello di Fuhrman, che prevede quattro gradi (dal grado I al IV) secondo crescenti livelli di anaplasia <sup>4</sup>. La determinazione, invece, dello *stadio* si basa sulle dimensioni del tumore primitivo, sulla diffusione ai linfonodi e sulla presenza di metastasi ematiche. La classificazione TNM (tumor node metastasis) dei tumori maligni è un sistema di classificazione comunemente utilizzato a livello internazionale, elaborato dall'Union Internationale Contre Cancer (UICC), in cui T si riferisce alle dimensioni del tumore primitivo (da 1 a 4 a seconda della grandezza crescente), N indica lo stato dei linfonodi vicini al tumore (da 0 a 3 in base alla crescente gravità) e M la presenza di metastasi a distanza (0 = nessuna metastasi, 1 = metastasi).

Malgrado i grandi e continui progressi nel campo della ricerca e della terapia, i tumori rimangono una delle principali emergenze sanitarie a livello mondiale; purtroppo non si è ancora riusciti a trovare una cura che risulti efficace per tutte le tipologie di tumori riscontrate. Un tumore solido, al momento della sua diagnosi clinica, solitamente è già in una fase avanzata del ciclo vitale; questo rappresenta un ostacolo importante in campo terapeutico. Quando un tumore diventa clinicamente evidente le cellule che lo compongono risultano ormai estremamente eterogenee, in quanto differiscono tra loro per invasività, capacità di accrescimento e metastatizzazione, cariotipo, sensibilità agli ormoni e risposta ai farmaci. Questa eterogeneità comporta l'acquisizione di un maggior grado di malignità, rendendo il tumore più aggressivo e invasivo. Secondo quanto riportato dall'American Cancer Society (ACS), il cancro è la seconda e terza causa di morte rispettivamente nei paesi industrializzati e in via di sviluppo; solamente le malattie cardiovascolari determinano un maggior numero di

decessi. La probabilità di insorgenza di tumori è in continuo aumento nei paesi sviluppati, in quanto la mortalità infantile e i decessi dovuti a malattie infettive sono ormai in declino, mentre è aumentata l'aspettativa di vita. Nel 2007 l'ACS aveva stimato più di 12 milioni di nuovi casi diagnosticati a livello mondiale, dei quali 5,4 milioni nei paesi industrializzati (675000 solo nell'Europa meridionale) e 6,7 nei paesi in via di sviluppo. Allo stesso tempo, era stata riportata una stima di 7,6 milioni di decessi dovuti a tumore (circa 20000 morti al giorno) <sup>5</sup>. Sempre in accordo con le linee guida dell'ACS, per il 2010 erano stati previsti circa 1,5 milioni di nuovi casi tumorali diagnosticati, con un numero di morti attese di quasi 600000 nei soli Stati Uniti d'America (USA) <sup>6</sup>. Entro il 2050 si prevede una crescita sostanziale dell'indice di insorgenza tumorale nel mondo, sino a 27 milioni di nuovi casi e 17,5 milioni di decessi, semplicemente a seguito di un incremento della popolazione e della vita media <sup>5</sup>. L'età influisce in maniera significativa sulla probabilità di sviluppare un cancro; la maggior parte dei carcinomi si manifesta infatti in età avanzata. Dunque in Europa, ed in particolar modo in Italia dove l'età media è in aumento a causa della diminuzione delle nascite, questo fenomeno rischia di assumere dimensioni preoccupanti; infatti, in Italia, per il solo anno 2005 erano stati previsti 250000 nuovi casi diagnosticati di tumore e circa 140000 decessi <sup>7</sup>.

### **1.2.2 IL CARCINOMA RENALE**

Nel rene possono svilupparsi tumori sia benigni che maligni; le neoplasie maligne sono molto importanti e tra questi il carcinoma a cellule renali è la forma più frequente.

Il tumore renale presenta un'incidenza mondiale annua del 2.5% in continua rapida crescita e si colloca al settimo e nono posto come neoplasia più comune rispettivamente negli uomini e nelle donne. In generale, l'incidenza del carcinoma renale è più elevata nelle società economicamente più sviluppate. Nel 2010 negli Stati Uniti sono stati diagnosticati più di 57000 nuovi casi e i decessi dovuti a questa patologia sono stati circa 13000 <sup>8</sup>. Nel corso degli ultimi decenni, si è osservato un aumento nei paesi a più alta incidenza. In Italia, per esempio l'incidenza è in crescita, mentre la mortalità è in riduzione <sup>9,10</sup>. Il trend sfavorevole di incidenza è probabilmente dovuto alla maggior diffusione della diagnostica per immagini, che tuttavia ha migliorato la percentuale di diagnosi precoce, con un effetto positivo sulle possibilità terapeutiche.

In particolare il carcinoma a cellule renali (RCC), che costituisce circa l'85% dei tumori renali primari e il 3% dei cancri più frequenti che insorgono in età adulta, ha un tasso di incidenza europea di 16.7 tra gli uomini e 7.6 nelle donne per 100000 persone/anno <sup>11</sup>. Esso insorge solitamente in individui anziani, generalmente intorno ai 60-70 anni di vita, e ha una prevalenza maschile con un rapporto maschi femmine di 3:1. Questa forma di neoplasia origina dall'epitelio tubulare e dunque rappresenta un adenocarcinoma renale <sup>12</sup>.

#### **1.2.2.1 Epidemiologia**

Sebbene siano stati individuati nei modelli animali numerosi fattori eziologici <sup>13</sup>, nell'uomo l'eziologia è tuttora poco conosciuta, ma alcuni fattori ambientali e comportamentali sembrano influire sull'insorgenza del carcinoma a cellule renali. Il fumo di tabacco è considerato uno dei maggiori fattori di rischio, infatti vi è un'incidenza doppia di carcinoma renale tra i fumatori di sigaretta ed anche i fumatori di pipa e sigaro risultano più suscettibili <sup>14,15</sup>. In uno studio di La Vecchia <sup>16</sup> è stata riportata un'incidenza del carcinoma a cellule renali 1,7 volte superiore tra gli ex fumatori rispetto ai non fumatori. Studi sia longitudinali che casi-controllo hanno riportato una relazione dose-effetto negli uomini: un progressivo aumento del rischio relativo fino a 2,3 nei fumatori accaniti. Inoltre è stato evidenziato come il rischio sia correlato direttamente con la durata del fumo e inversamente proporzionale all'età di inizio. Allo stesso modo, tra gli ex-fumatori, il rischio era inversamente proporzionale al tempo intercorso dalla sospensione del fumo. Stimando una percentuale di fumatori nella popolazione adulta tra il 20 e il 40%, l'eliminazione del consumo di tabacco potrebbe prevenire dal 16 al 28% dei casi di carcinoma del rene negli adulti <sup>17</sup>. Studi internazionali hanno identificato come fattori aggiuntivi di rischio anche l'obesità severa, l'ipertensione, l'assunzione di analgesici, il consumo eccessivo di alcol e l'elevata esposizione a contaminanti industriali (metalli pesanti o tricloroetilene) <sup>18-20</sup>. Uno studio internazionale ha evidenziato come l'obesità sia associata ad un rischio relativo di morte per carcinoma renale di 1,7 per gli uomini e 4,8 per le donne in sovrappeso <sup>21</sup>. Fattori genetici e pre-esistenti patologie renali e del tratto urinario possono incrementare il rischio di insorgenza; inoltre è stato riportato che pazienti sottoposti a dialisi per lungo tempo presentano un aumento dell'incidenza di malattia cistica acquisita del rene, che a sua volta predispone al carcinoma renale <sup>22-24</sup>. La maggior parte dei tumori renali è sporadica, tuttavia esistono alcune forme di cancro familiare autosomico dominante, che colpiscono

generalmente gli individui con un'età sostanzialmente più giovane e che rappresentano solo il 4% dei tumori renali <sup>25</sup>:

- *Sindrome di Von Hippel-Lindau (VHL)*: circa due terzi dei pazienti con questa sindrome sviluppano carcinomi a cellule renali bilaterali e multipli.
- *Carcinoma a cellule chiare ereditario (familiare)*: è una forma tumorale strettamente confinata al rene, ma comporta comunque anomalie riguardanti il gene VHL o geni associati.
- *Carcinoma papillifero ereditario*: questa forma è caratterizzata da tumori multipli bilaterali con istologia papillare e coinvolge mutazioni nel proto-oncogene MET.

### **1.2.2.2 Classificazione**

La ricerca di una classificazione semplice e appropriata dei tumori renali ha impegnato anatomopatologi e urologi per tutto il secolo. Il problema di una corretta classificazione rimane attualmente aperto a causa della notevole varietà degli istotipi conosciuti e del continuo evolversi delle metodiche di studio adottate dagli anatomopatologi. Questo spinge ad una continua revisione della classificazione dei tumori renali. La più completa classificazione è quella descritta da Deming e Harvard nel 1970, che include 11 categorie di tumori del rene con molteplici sottoclassificazioni; quest'ultime comprendono tutte le neoformazioni renali, frequenti e rare, tra cui anche le malattie cistiche renali ed i tumori retroperitoneali che si estendono al rene. Questa classificazione risulta essere semplice ed accurata (Tabella 1) <sup>26,27</sup>.

Successivamente, nel 1980, Glenn ha proposto una classificazione più semplice che elenca tutte le lesioni che determinano l'insorgenza di una massa renale o di una neoformazione <sup>28</sup>. Essa distingue i tumori renali in benigni, tumori della pelvi, tumori pararenali, tumori embrionali, nefrocarcinoma e altre forme neoplastiche maligne (primarie e secondarie) (Tabella 2). L'oncocitoma è stato aggiunto in un secondo tempo all'originaria classificazione di Glenn. Oggi è noto che il vero oncocitoma è una entità a sé stante, la cui cellula di origine è diversa da quella del carcinoma a cellule renali e la cui natura è sempre benigna.

<b>Tumori della capsula renale</b>	<b>Tumori neurogeni</b>
Fibroma	Neuroblastoma
Leiomioma	Simpaticoblastoma
Lipoma	Schw annoma
Misto	
<b>Tumori del parenchima renale maturo</b>	<b>Tumori di tessuti eteroplastici</b>
Adenoma	Adiposo
Adenocarcinoma	Muscolo liscio
Ipernefroma	Residui surrenalici
Carcinoma a cellule renali	Endometriosi
Carcinoma alveolare	Cartilagine
	Osso
<b>Tumori del parenchima renale immaturo</b>	<b>Derivati mesenchimali</b>
Nefroblastoma (Wilms)	Tessuto connettivo
Carcinoma embrionario	Fibroma
Sarcoma	Fibrosarcoma
	Sarcoma osteogenico
<b>Tumori epiteliali dalla pelvi renale</b>	Tessuto adiposo
Papillomi a cellule transizionali	Lipoma
Carcinomi a cellule transizionali	Liposarcoma
Carcinoma a cellule squamose	Tessuto muscolare
Adenocarcinoma	Leiomioma
	Leiomiosarcoma
<b>Cisti</b>	Rabdomiosarcoma
Solitaria	
Unilaterali multiple	<b>Tumori solidi pararenali/perirenali</b>
Caliceale	Lipoma
Piogena	Sarcoma
Calcifica	Liposarcoma
Ectasia tubolare	Fibrosarcoma
Sclerosi tuberosa	Linfangiosarcoma
Cistadenoma	Cancro
Cistadenoma papillare	Teratoma
Dermoide	Linfoblastoma
Cisti pararenali/perirenali	Neuroblastoma
Idrocele renale	Morbo di Hodgkin
Linfatiche	
Wolffiane	<b>Tumori secondari</b>
Maligne	Cancro
<b>Tumori vascolari</b>	Sarcoma
Emangioma	Blastoma
Amartoma	Granuloma
Linfangioma	Timoma
	Testicolare
	Renale

**Tabella 1.** Classificazione dei carcinomi renali proposta da Deming e Harvard<sup>29</sup>.

<b>Tumori benigni</b>
Capsula renale
Parenchima renale
Tumori vascolari
Lesioni cistiche, displasia, idronefrosi
Tumori eteroplastici, mesenchimali
Oncocitoma vero
<b>Tumori della pelvi renale</b>
Papilloma benigno
Carcinomi transizionali, a cellule squamose, adenocarcinomi
<b>Tumori pararenali</b>
Benigni
Maligni
<b>Tumori embrionari</b>
Nefroblastoma (tumore di Wilms)
Tumori embrionari, mesoteliomatosi
Sarcomi
<b>Nefrocarcinoma</b>
Carcinoma a cellule renali, adenocarcinoma, ipernefroma
Cistoadenocarcinoma papillare
<b>Altri tumori</b>
Primari:
Mesenchimali
Emangiopericitoma
Mieloma
Secondari:
Lesioni metastatiche

**Tabella 2.** Classificazione di Glenn dei tumori del rene<sup>29</sup>.

La classificazione proposta da Barbaric (1994) distingue le masse renali sulla base delle caratteristiche anatomopatologiche (maligne, benigne o infiammatorie) o radiologiche (cisti semplici, cisti complesse, tumori del tessuto adiposo ed altri) e può risultare utile nella diagnosi differenziale (Tabelle 3-4)<sup>30</sup>.

<b>CLASSIFICAZIONE ANATOMOPATOLOGICA DELLE MASSE RENALI</b>		
<b>Maligne</b>	<b>Benigne</b>	<b>Inflammatorie</b>
Carcinoma renale	Cisti semplice	Ascesso
Linfoma	Angiomiolipoma	Pielonefrite
Leiomiোসарcoma	Oncocitoma	Pielonefrite xantogranulomatosa
Emangiopericitoma	Pseudotumore	Cisti renale infetta
Liposarcoma	Reninoma	Tubercolosi
Rabdomiosarcoma	Feocromocitoma	Granuloma reumatoide
Schwannoma	Leiomioma	
Osteosarcoma	Emangioma	
Istiocitoma fibroso	Nefroma cistico	
Neurofibrosarcoma	Fibroma	
Metastasi	Malformazione arterovenosa	
Infiltrazione da neoplasie contigue	Emangiopericitoma	
Carcinoide	Ibernoma	
Tumore di Wilms	Aneurisma dell'arteria renale	
Tumore di Wilms nell'adulto		
Nefroma mesoblastico		
Leucemia		

**Tabella 3.** Classificazione anatomopatologica dei tumori del rene proposta da Barbaric<sup>30</sup>.

<b>CLASSIFICAZIONE RADIOLOGICA DELLE MASSE RENALI</b>			
<b>Cisti semplici</b>	<b>Cisti complesse</b>	<b>Tumori adiposi</b>	<b>Tutti gli altri</b>
Cisti	Nefroma cistico	Angiomiolipoma	Carcinoma renale
Cisti multiple	Carcinoma renale	Lipoma	Metastasi
Cisti parapieliche	Cisti emorragiche	Ibernoma	Linfoma
Diverticolo caliceale	Metastasi	Liposarcoma	Sarcoma
	Tumore di Wilms		Nefroma lobare
	Cisti infetta		Ascesso
	Linfoma		Tubercolosi
	Tubercolosi		Oncocitoma
	Cisti settata		Fibroma
	Aneurisma dell'arteria renale		Pielonefrite xantogranulomatosa
	Malformazione arterovenosa		Feocromocitoma
	Idrocalice		Tumore di Wilms
			Granuloma reumatoide
			Reninoma
			Leiomioma
			Emangioma
			Nefroblastomatosi
			Adenocarcinoma
			Carcinoma a cellule transizionali
			Carcinoide

**Tabella 4.** Classificazione radiologica dei tumori del rene proposta da Barbaric<sup>30</sup>.



Oggi le neoplasie del rene sono classificate secondo il sistema redatto dalla World Health Organisation (WHO) nel 2004. Esso rappresenta l'evoluzione di quello formulato a Heidelberg e Rochester nel 1997 <sup>31</sup>. La classificazione WHO 2004 definisce numerosi sottotipi di tumori, che presentano aspetti istopatologici, alterazioni genetiche e comportamenti clinici distinti. In questa classificazione sono inclusi sia tumori benigni sia tumori maligni ed un gruppo indicato come "carcinoma a cellule renali inclassificabile", nel quale sono incluse tutte le neoplasie renali che non rientrano in nessuna delle categorie ben definite (Tabella 5) <sup>32</sup>.

Familial renal cancer
Renal cell tumors
Malignant
Clear cell renal cell carcinoma
Multilocular clear cell renal cell carcinoma
Papillary renal cell carcinoma
Chromophobe renal cell carcinoma
Carcinoma of the collecting ducts of Bellini
Renal medullary carcinoma
Xp11 translocation carcinomas
Carcinoma associated with neuroblastoma
Mucinous tubular and spindle cell carcinoma
Renal cell carcinoma unclassified
Benign
Papillary adenoma
Oncocytoma
Metanephric tumors
Metanephric adenoma
Metanephric adenofibroma
Metanephric stromal tumors
Mixed mesenchymal and epithelial tumors
Cystic nephroma
Mixed epithelial and stromal tumor
Synovial sarcoma
Nephroblastic tumors
Nephrogenic rests
Nephroblastoma
Cystic partially differentiated nephroblastoma
Neuroendocrine tumors
Carcinoid
Neuroendocrine carcinoma
Primitive neuroectodermal tumor
Neuroblastoma
Pheochromocytoma
Other tumors
Mesenchymal tumors
Haematopoietic and lymphoid tumors
Germ cell tumors
Metastatic tumors

**Tabella 5.** Classificazione anatomopatologica dei tumori del rene proposta da Barbaric <sup>32</sup>.

I tumori benigni comprendono l'adenoma metanefrico, l'adenofibroma metanefrico, l'oncocitoma e l'adenoma papillare. L'oncocitoma rappresenta un tumore non così raro, circa il 5% delle neoplasie reseccate chirurgicamente. Le neoplasie maligne,

invece, includono diverse sottotipologie istologiche del carcinoma a cellule renali (RCC), tra cui le principali forme sono:

- *RCC a cellule chiare o “convenzionale” (ccRCC)*: è la variante più frequente in quanto rappresenta il 60-80% dei cancri a cellule renali <sup>33</sup> ed ha origine dall'epitelio tubulare prossimale della corteccia renale <sup>34</sup>. Macroscopicamente si presenta di colorito giallastro, talora con aree emorragiche, necrotiche o parzialmente cistiche. All'esame istologico, il tumore è caratterizzato da una ricca neovascolarizzazione che circonda le cellule, le quali presentano un citoplasma chiaro o granuloso; questa cellularità chiara deriva da un artefatto causato dalla procedura istologica che, rimuovendo il glicogeno ed i lipidi all'interno dei citoplasmi li rende otticamente vuoti al microscopio ottico dopo colorazione con ematossilina ed eosina. La lesione può essere sporadica o a carattere familiare, associata a sindromi genetiche quali la sindrome di Von Hippel-Lindau. La trasformazione sarcomatoide avviene nel 5% circa di tale neoplasia <sup>35</sup>. Inoltre molto importanti sono anche le forme a presentazione cistica, tra le quali fortunatamente ve ne sono alcune poco aggressive <sup>36</sup>.
- *RCC papillare*: rappresenta circa il 10-15% dei tumori renali, sono caratterizzati da una crescita papillare e si manifestano sia in forma familiare che sporadica. Macroscopicamente si può presentare in forma solida o avere una degenerazione necrotica centrale simil-cistica. All'indagine istologica, la caratteristica principale è l'aggregazione papillare con assi fibrovascolari con macrofagi e/o con necrosi colesterinica. Nel 1997, Delahunt ed Eble <sup>37</sup> hanno descritto due sottotipi di carcinoma papillare, il *tipo 1* in cui la papilla presenta un epitelio monostratificato, a citoplasma basofilo e con nuclei privi di nucleoli evidenti ed il *tipo 2*, che è invece costituito da papille rivestite da epitelio pseudo-stratificato, a citoplasma più eosinofilo e con grado nucleare più elevato.
- *RCC cromofobo*: rappresenta circa il 5% dei cancri renali ed è costituito da grandi cellule poligonali con membrana prominente e citoplasma debolmente eosinofilo, spesso con aloni attorno al nucleo. Si possono riscontrare binucleazioni e calcificazioni pulvirulente. Alla microscopia elettronica, il citoplasma appare ripieno di microvescicole e mitocondri con creste lamellari. Macroscopicamente, si presenta di colorito brunastro o marrone. Esso, come l'oncocitoma, deriva dalle cellule intercalate dei dotti collettori ed ha una prognosi più favorevole rispetto a quella dei tumori a cellule chiare e papillari.

### 1.2.2.3 *Citogenetica*

Il carcinoma a cellule renali comprende un gruppo di tumori eterogeneo a livello clinico-patologico con svariata prognosi; le differenze tra i sottotipi di RCC sono verosimilmente dovute ad una diversa citogenesi e progressione molecolare<sup>38</sup>. Sono state identificate differenti alterazioni genetiche nei diversi sottotipi di neoplasie renali. Tali alterazioni sono utili nel formulare una corretta diagnosi e definire una più precisa prognosi, oltre che a selezionare appropriatamente i pazienti per differenti opzioni terapeutiche. I tumori renali si presentano usualmente come malattie sporadiche, ma possono insorgere anche in forma familiare.

Nel 1987, alcuni ricercatori del National Cancer Institute (NCI) pubblicarono sulla rivista *Nature* i risultati dei loro studi sul gene responsabile dell'insorgenza del carcinoma renale ed evidenziarono la presenza nel tessuto neoplastico di frequenti alterazioni del cromosoma 3<sup>39</sup>. In seguito fu documentato che le principali alterazioni cromosomiche che si osservano nel carcinoma renale a cellule chiare sono infatti delezioni e traslocazioni del braccio corto del cromosoma 3 (3p)<sup>40,41</sup>. Nel 98% di casi di questo tumore si ha una delezione o una traslocazione non bilanciata cromosomica (3;6, 3;8, 3;11) con perdita della più piccola regione sovrapposta del cromosoma 3 (3p14 fino a 3p26). In questa regione è collocato il gene VHL (3p25.3)<sup>42,43</sup>. La mutazione del gene VHL è stata identificata esclusivamente in questo tipo di tumore e non appare associata né al grado né allo stadio tumorale; infatti risulta frequente nei carcinomi a cellule chiare, in quelli granulari e sarcomatoidi, ma non nel tipo papillifero<sup>44</sup>. La sindrome di von Hippel-Lindau è una rara patologia neoplastica familiare (1 caso ogni 36000 nascite) che comporta la comparsa nello stesso individuo di tumori multipli in sedi diverse, quali neoplasie e cisti renali bilaterali e multifocali, tumori cerebellari e del midollo spinale (emangioblastoma), emangioma retinico, feocromocitoma, tumori endocrini del pancreas e cistoadenoma dell'epididimo. I tumori renali sono carcinomi a cellule chiare con tendenza all'invasione e alla metastatizzazione<sup>45</sup> e se non diagnosticati e trattati precocemente, rappresentano la causa di morte nel 35-45% dei pazienti affetti da questa sindrome. Un secondo allele non delezionato del gene VHL presenta mutazione somatica o inattivazione indotta da ipermetilazione in circa l'80% dei ccRCC, evidenziando che il gene VHL si comporta come un gene soppressore tumorale sia nelle forme sporadiche che familiari. La proteina codificata dal gene VHL è una componente del complesso proteico che include elongina B, elongina C e cullina 2; la perdita dell'attività funzionale del gene soppressore VHL comporta la

perdita dell'attività ligasi di E3-VHL, con la conseguente stabilizzazione di HIF (hypoxia inducible factor) e l'espressione dei geni inducibili dall'ipossia come il vascular endothelial growth factor (VEGF) <sup>46</sup>. Le proteine VHL formano complessi anche con altre proteine e innescano una degradazione ubiquitaria dei fattori HIFs, HIF1alpha e HIF2alpha; HIF è un fattore di trascrizione che regola la degradazione di geni come VEGF, GLUT-1 (glucose transporter 1), PDGF (platelet derived growth factor), EGFR (epidermal growth factor receptor) e TGFalpha (transforming growth factor alpha). Il danno al gene VHL impedisce che il complesso VHL inneschi la degradazione di HIF. HIF si accumula, ed il risultato è l'espressione eccessiva dei geni VEGF, EGFR e TGFalpha. Questo ha portato allo sviluppo di agenti che hanno come bersaglio il complesso VHL, come potenziale approccio terapeutico nei pazienti affetti da RCC avanzato; risultati promettenti sono stati ottenuti anche con agenti antiVEGF <sup>47</sup>. È stato inoltre suggerito che, nel carcinoma renale, intervenga l'attivazione molecolare di alcuni proto-oncogeni alla base delle alterazioni citogenetiche. La sovraespressione di c-myc e dell'mRNA del recettore per l'epidermal growth factor (EGFR) (Erb B-1) e la sottoespressione dell'mRNA dell'HER-2 (Erb B-2) si osservano nella maggioranza dei pazienti affetti da carcinoma a cellule renali <sup>48,49</sup>. In ogni caso non è ancora ben chiaro come tali alterazioni di espressione contribuiscano allo sviluppo del cancro; il continuo progresso nella conoscenza delle vie di trasduzione del segnale permetterà di definire meglio il ruolo di questi proto-oncogeni. Oka e collaboratori hanno dimostrato come la via della MAP (mitogen activated protein) chinasi, che comprende anche i prodotti degli oncogeni Ras e Raf-1, sia attivata in un elevato numero di neoplasie renali e, più spesso, nei carcinomi di grado elevato <sup>50</sup>. E' stato pertanto suggerito che l'attivazione della cascata della MAP kinasi svolga un ruolo significativo nella carcinogenesi renale e un suo maggior grado di attivazione potrebbe essere associato ad un potenziale maligno più elevato.

I carcinomi papilliferi non sono associati a delezioni in 3p, in quanto le anomalie citogenetiche più importanti le trisomie 7,16 e 17 e la perdita della Y nei pazienti maschi [t (X,1)] nella forma sporadica e la trisomia 7 nella forma familiare. Il gene per la forma familiare è stato mappato su un locus del cromosoma 7, che comprende il locus per MET, un proto-oncogene che serve come recettore delle tirosino-kinasi per il fattore di crescita epatocitario; quest'ultimo media la crescita cellulare, la mobilità, l'invasione e la differenziazione morfogenetica. Sono state identificate entrambe le mutazioni della linea germinale e somatica nel dominio delle tirosino-kinasi del gene

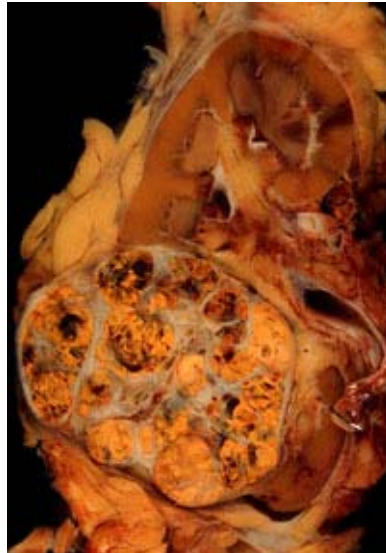
MET, rendendo lo stesso mutato un oncogene candidato nel cancro. Un secondo gene, PRCC (per carcinoma renale papillare) sul cromosoma 1 è risultato coinvolto nei tumori sporadici, soprattutto nei bambini che manifestano traslocazioni X,1<sup>51</sup>. Sono stati descritte inoltre alterazioni molecolari nelle proteine delle cellule del carcinoma renale come P53, metalloproteinasi e telomerasi<sup>52-54</sup>. I progressi tecnologici nel settore della biologia molecolare, permetteranno di identificare ulteriori alterazioni genetiche e molecolari nel carcinoma renale.

#### **1.2.2.4 Fattori di crescita**

I fattori di crescita trasformanti (transforming growth factors, TGF) alfa e beta sono fattori di crescita regolatori prodotti dal tumore, che possono essere correlati allo sviluppo del carcinoma a cellule renali<sup>55</sup>. Il TGF $\alpha$  si lega all'EGFR e, poiché sia il TGF $\alpha$  che l'EGFR sono sovraespressi nelle neoplasie renali, è possibile che la loro interazione svolga un ruolo significativo nella promozione della trasformazione e/o proliferazione delle cellule tumorali, probabilmente attraverso un meccanismo autocrino. Il TGF $\beta$  viene prodotto in una forma biologicamente inattiva da linee cellulari del carcinoma renale umano in coltura e, dopo incubazione con TGF $\beta$  esogeno, la proliferazione di tali cellule risulta inibita<sup>56</sup>. Sembra, quindi, che alterazioni nella produzione di fattori di crescita con azione stimolante o inibente e la risposta a tali sostanze possano determinare l'insorgenza di uno squilibrio nei meccanismi di crescita, la perdita dell'inibizione autocrina della proliferazione e lo sviluppo del cancro.

#### **1.2.2.5 Morfologia e anatomia patologica**

Il carcinoma renale può sorgere in qualsiasi zona del rene, ma più spesso si colloca ai poli, soprattutto quello superiore. Solitamente le neoplasie a cellule chiare (Figura 3) sono lesioni solitarie e unilaterali, masse sferiche del diametro da 3 a 15 cm, composte da tessuto grigiobianco-giallastro, che alterano la configurazione del rene. Spesso vi sono zone di necrosi ischemica e focolai di emorragia. Non sono dotati di una vera e propria capsula, ma posseggono sempre una pseudocapsula composta da parenchima compresso e tessuto fibroso. I tumori papillari possono essere multifocali e bilaterali, generalmente emorragici e cistici.



**Figura 3.** Carcinoma a cellule renali di 8 cm nel polo inferiore del rene. Il tumore mostra un'estensione oltre la superficie corticale, senza però infiltrare il tessuto adiposo perinefrico. (Immagine tratta da [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org)).

Aumentando progressivamente di volume, il tumore può estendersi ai calici e alla pelvi e a volte raggiungere persino l'uretere. Un'altra caratteristica peculiare di questa neoplasia è la sua tendenza a invadere la vena renale, formando un blocco di cellule neoplastiche all'interno del vaso; l'ulteriore accrescimento può portare ad un trombo neoplastico nella cava inferiore. I tumori di dimensioni maggiori ed a malignità più elevata possono invadere localmente le strutture e gli organi contigui.

Gli studi al microscopio elettronico hanno stabilito che le cellule tubulari prossimali sono la sede di origine del carcinoma a cellule renali. Le cellule dei tubuli prossimali posseggono numerosi microvilli di superficie, che conferiscono loro l'aspetto di orsetto a spazzola, e contengono un citoplasma più complesso di quello delle cellule del tubulo distale. Le caratteristiche ultrastrutturali delle cellule prossimali si riscontrano in vario grado nella maggior parte dei carcinomi renali; tuttavia, l'orletto a spazzola non è pienamente sviluppato ed è presente come tale solo in alcune cellule neoplastiche. L'origine del carcinoma renale dalle cellule tubulari prossimali è stata sostenuta da numerosi ricercatori<sup>57</sup>. L'aspetto ultrastrutturale dei vari tipi cellulari che compongono il carcinoma renale classico è stato dettagliatamente descritto da Colvin e Dickersin nel 1978<sup>58</sup>. Sebbene sia raro riscontrare tumori assolutamente puri, i carcinomi renali possono essere grossolanamente suddivisi in quattro tipi istologici: a cellule chiare, a cellule granulose, a cellule tubulopapillari e sarcomatoidi<sup>59</sup>. Sulla base di una analisi combinata delle caratteristiche genetiche ed anatomopatologiche,

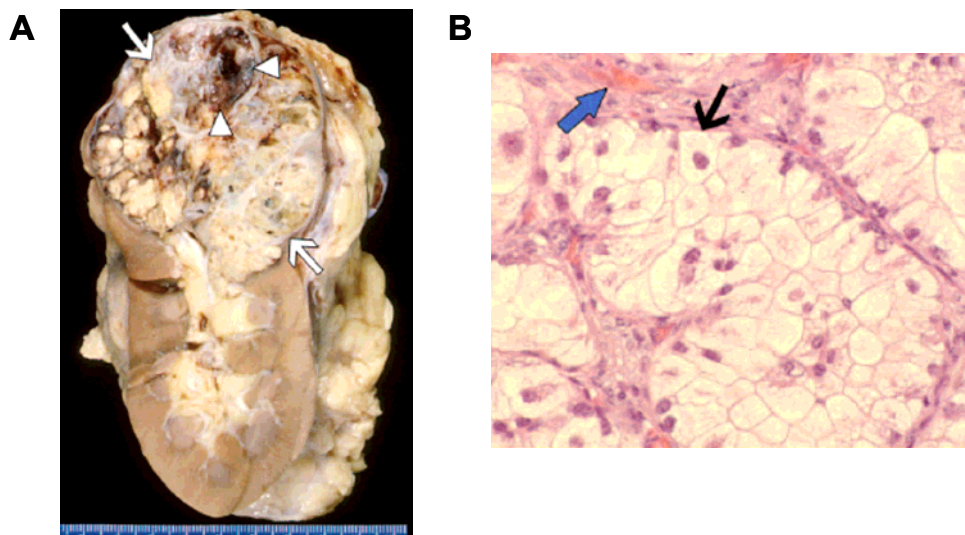
è stata poi proposta da Kovacs una migliore classificazione dei tumori renali <sup>60</sup> (Tabella 6).

CLASSIFICAZIONE DELLE NEOPLASIE A CELLULE RENALI
Oncocitoma
Carcinoma Cromofobo
Neoplasia Papillifera
Adenocarcinoma non altrimenti specificato (chiaro/granulare)
Carcinoma dei Dotti Collettori
Tumori Neuroendocrini
Carcinoide
Carcinoma a piccole cellule

**Tabella 6.** Classificazione dei tumori renali secondo Kovacs <sup>60</sup>.

Attualmente la classificazione delle neoplasie renali è basata sulle indicazioni fornite della WHO nel 2004 <sup>32</sup>; l'RCC comprende un gruppo di tumori eterogeneo a livello clinico-patologico con svariata prognosi, in cui le principali forme sono: adenocarcinoma a cellule chiare (60-80%), adenocarcinoma papillare (10-15%), adenocarcinoma a cellule cromofobe (4-6%) e lesioni non classificate (1%) <sup>33,34</sup>. Data quest'ampia variabilità istologica è molto importante un'adeguata caratterizzazione del tumore al fine di ottenere una diagnosi precoce, una prognosi dettagliata e un monitoraggio continuo della malattia.

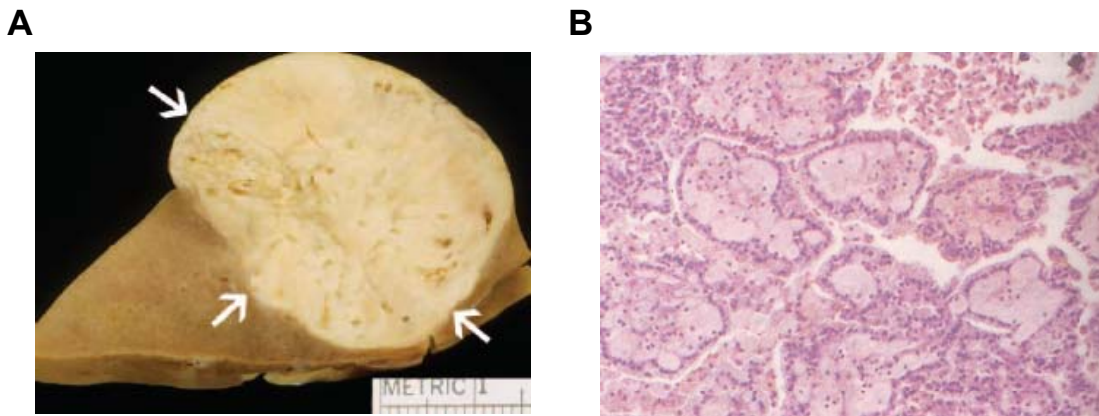
Nel carcinoma a cellule chiare (Figura 4) la modalità di crescita varia da aspetti papillari a solidi, trabecolari o tubulari. Le cellule neoplastiche hanno una forma rotondeggiante o poligonale e abbondante citoplasma chiaro o granuloso, contenente glicogeno e lipidi (sostanze che vengono per la maggior parte estratte dai solventi impiegati per le preparazioni istologiche). Solo un limitato numero di tumori contiene unicamente cellule chiare; di solito, infatti, è presente anche una quota di cellule granulari (cellule scure) che talvolta può rappresentare l'unica componente cellulare della neoplasia. Le cellule granulari hanno un citoplasma eosinofilo e abbondanti mitocondri. All'analisi immunohistochimica, circa il 50% delle cellule tumorali, soprattutto se di grado elevato, esprime vimentina. Cellule vimentina-positive sono più frequenti nei carcinomi renali sarcomatoidi e più rare nelle forme prive di zone fusiformi. La quasi totalità degli adenocarcinomi renali esprime cheratina 8 e 18, oltre all'antigene epiteliale di membrana.



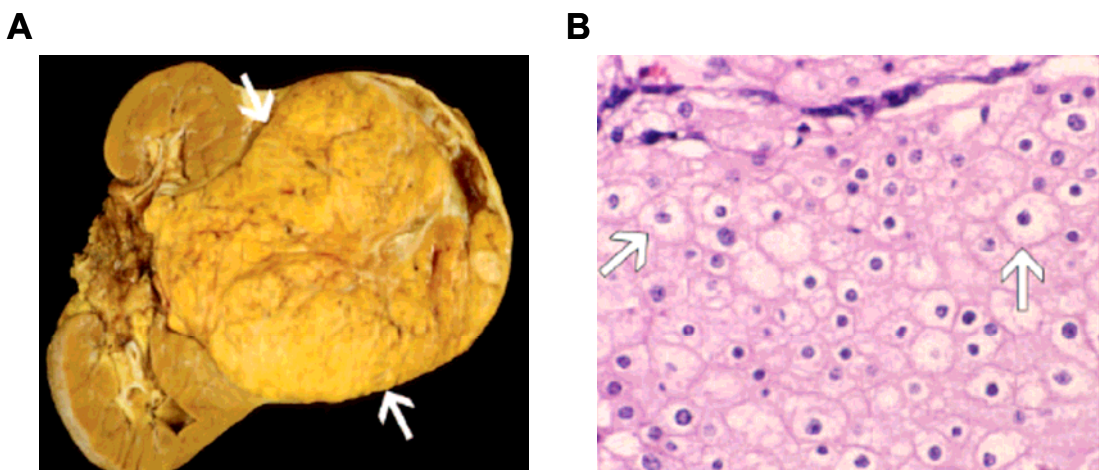
**Figura 4.** Carcinoma renale a cellule chiare (ccRCC). **A.** Aspetto macroscopico. Il tumore mostra una crescita nodulare (freccia) con zone di necrosi ischemica e focolai di emorragia (punta di freccia). **B.** Fotomiografia (colorazione con ematossilina-eosina, EE). È possibile notare le caratteristiche cellule neoplastiche di forma rotondeggiante o poligonale e abbondante citoplasma chiaro (freccia nera) con marcata vascolarizzazione (freccia blu) (Immagini tratte da Prasad SR, et al. Common and Uncommon Histologic Subtypes of Renal Cell Carcinoma: Imaging Spectrum with Pathologic Correlation. *Radiographics* 2006; 26: 1795-1806).

I tumori renali hanno una ricca vascolarizzazione ramificata e possono mostrare aree cistiche e solide. La maggior parte è ben differenziata, ma alcune forme presentano nuclei atipici e cellule giganti. Il carcinoma papillifero (Figura 5) si presenta di piccole dimensioni, quasi interamente capsulato e confinato alla corteccia. Esso è costituito da cellule cuboidali o colonnari basse, disposte in formazioni papillari; possono essere anche presenti cellule schiumose interstiziali e corpi psammomatosi. Lo stroma è scarso e altamente vascolarizzato. Il carcinoma cromofobo (Figura 6) è composto da cellule debolmente eosinofile, spesso con alone perinucleare, disposte in cordoni solidi; alla microscopia elettronica, il citoplasma mostra numerose strutture reticolari (microvescicole) povere in glicogeno. Alcuni studi recenti suggeriscono che i pazienti con tumori cromofobi hanno, rispetto a quelli con il classico carcinoma renale a cellule chiare, una prognosi migliore.





**Figura 5.** Carcinoma RCC papillifero. **A.** Aspetto macroscopico. Il tumore mostra una massa solida bianca (freccie). Scala in centimetri **B.** Fotomiografia (colorazione con ematossilina-eosina, EE). È possibile notare papille il cui asse contiene macrofagi dal citoplasma schiumoso (Immagine A tratta da Prasad SR, et al. Common and Uncommon Histologic Subtypes of Renal Cell Carcinoma: Imaging Spectrum with Pathologic Correlation. Radiographics 2006; 26: 1795-1806. Immagine B tratta da Il rene. In Le basi patologiche delle malattie, a cura di Cotran, Kumar, Collins. 6a edizione. Robbins Piccin 2000; cap 21).

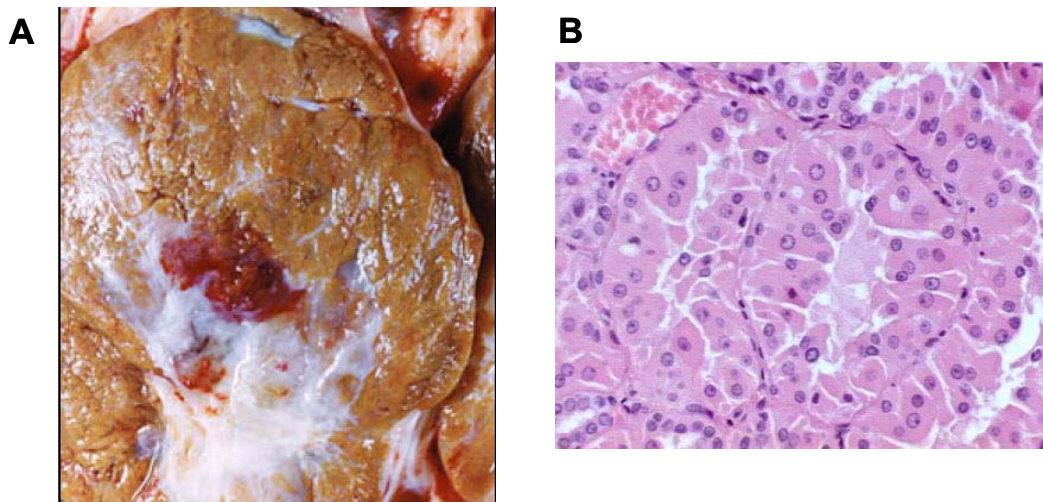


**Figura 6.** Carcinoma RCC cromofobo. **A.** Aspetto macroscopico. Il tumore mostra una massa espansiva solida con superficie di colore giallo-bruno (freccie). **B.** Fotomiografia (colorazione con ematossilina-eosina, EE). È possibile notare caratteristici aloni perinucleari (Immagini tratte da Prasad SR, et al. Common and Uncommon Histologic Subtypes of Renal Cell Carcinoma: Imaging Spectrum with Pathologic Correlation. Radiographics 2006; 26: 1795-1806).

Le alterazioni sarcomatoidi si manifestano raramente in tutte le tipologie di carcinoma a cellule renali e comportano un quadro clinico ancor più sfavorevole. La variante sarcomatoide ha un tipico pattern fusiforme, un comportamento aggressivo ed una prognosi infausta. Le cellule fusiformi ricordano le cellule mesenchimali pleomorfe e la differenziazione dal fibrosarcoma può essere difficile.

Il carcinoma dei dotti collettori (dotti di Bellini) una variante rara di RCC. È strettamente correlato alle cellule del sistema collettore midollare; si localizza a livello midollare e presenta una colorazione biancastra. Le cellule neoplastiche sono di tipo tubulare e mostrano un citoplasma basofilo con nuclei anaplastici.

L'oncocitoma (Figura 7) è un tumore epiteliale, che si presume derivi dalle cellule intercalari del tubulo collettore distale. Macroscopicamente, appare di colore brunastro, relativamente omogeneo, ben capsulato e può raggiungere dimensioni cospicue (più di 12 cm di diametro). Le cellule neoplastiche hanno un abbondante citoplasma eosinofilo con nuclei piccoli e rotondi, e mostrano numerosi mitocondri. I nuclei sono generalmente rotondi. Benché siano riportati alcuni casi con metastasi, il tumore è considerato benigno.



**Figura 7.** Oncocitoma renale. **A.** Aspetto macroscopico. **B.** Fotomiografia (colorazione con ematossilina-eosina, EE). (Immagine A tratta da [www.medscape.com](http://www.medscape.com). Immagine B tratta da <http://eusalud.uninet.edu> ).

Molti ricercatori hanno correlato i diversi sistemi di stadiazione basati sul grado di differenziazione cellulare con la prognosi. È ormai opinione comune che il grado nucleare sia il fattore prognostico più importante e, a differenza dell'istotipo, la sua validità predittiva sia indipendente dallo stadio di malattia <sup>4</sup>. I tumori con nuclei simili a quelli delle cellule normali mostrano un basso potenziale maligno, mentre i tumori con nuclei bizzarri ed eterogenei, tipici ad esempio delle neoplasie a cellule fusate, sono caratterizzati da una prognosi peggiore. Non è stata evidenziata una differenza significativa nella sopravvivenza tra i pazienti i cui tumori contengono cellule chiare e i pazienti con neoplasie composte da cellule granulari, mentre nelle neoplasie a cellule fusate la prognosi è peggiore indipendentemente dal grado nucleare. È stato dimostrato che il contenuto nucleare di DNA misurato mediante la citometria a flusso

è correlabile con il comportamento tumorale <sup>61</sup>. La maggior parte delle casistiche hanno confermato l'esistenza di una relazione tra la ploidia del DNA e il grado nucleare, sicché un'elevata percentuale di tumori anaplastici contengono cellule aneuploidi. Analogamente la ploidia del DNA e la prognosi dei pazienti con stadi diversi di carcinoma renale sembrano correlate <sup>62</sup>.

#### **1.2.2.6 Quadro clinico**

I classici sintomi, *dolore costo-vertebrale*, *massa palpabile* ed *ematuria*, compaiono sfortunatamente insieme solo nel 10% dei casi. Più frequente è la presenza di uno o due di questi sintomi o segni obiettivi. L'ematuria, cioè la presenza di sangue nelle urine, si manifesta nel 90% dei casi; tuttavia è di solito intermittente e a volte lieve, per cui il tumore può rimanere silente sino a che non raggiunga grosse dimensioni. È in questo momento che il tumore può dare origine a sintomi generalizzati come febbre, malessere, debolezza e perdita di peso. La crescita asintomatica si osserva in molti pazienti, tanto che il tumore può già aver raggiunto dimensioni considerevoli al momento della diagnosi. Tuttavia, esami radiologici (es. tomografia computerizzata o risonanza magnetica) per lo più eseguiti per indicazioni diverse da quelle renali, hanno consentito negli ultimi anni di individuare un numero sempre maggiore di masse renali in fase precoce; questo ha portato a significativi progressi nella diagnosi, stadiazione e trattamento dei pazienti.

Il carcinoma renale tende, inoltre, a generare sintomi sistemici non legati all'organo di origine; infatti, può causare sindromi paraneoplastiche, attribuite ad una irregolare produzione di ormoni: policitemia, ipercalcemia, ipertensione, disfunzione epatica, sindrome di Cushing, reazioni leucemoidi e amiloidosi. L'ipertensione è secondaria all'occlusione di un'arteria segmentarla o alla produzione di renina o sostanze renino-simili. La disfunzione epatica non metastatica, che prende il nome di sindrome di Stauffer, è caratterizzata da alterazione dei test di funzionalità epatica, diminuzione dei globuli bianchi, febbre e fenomeni di necrosi epatica <sup>63</sup>. Dopo la nefrectomia, la funzione epatica di questi soggetti generalmente ritorna nei limiti di norma; è questo un importante segno prognostico ove si consideri che nell'88% di tali pazienti la sopravvivenza è superiore ad 1 anno. La persistenza o il recidivare di questa sindrome è quasi invariabilmente associata alla recidiva tumorale. Un'ipercalcemia, la cui eziologia rimane oscura, è stata osservata in oltre il 10% dei pazienti con carcinoma renale.

Una delle caratteristiche più significative di questa neoplasia è la tendenza a metastatizzare prima di dare origine a qualsiasi segno o sintomo locale. Più di un

terzo dei pazienti il tumore risulta già metastatizzato al momento della diagnosi. Se la massa tumorale è localizzata nel parenchima renale la percentuale di sopravvivenza a 5 anni è tra il 60 e 90%, diminuendo considerevolmente sino al 30% nei pazienti in stadio avanzato e < 10% in presenza di metastasi distali<sup>64,65</sup>. Le sedi più comuni di metastasi sono i polmoni e le ossa, seguite in ordine di frequenza dai linfonodi regionali, dal fegato, dai surreni e dall'encefalo.

#### **1.2.2.7 Diagnosi**

Il carcinoma renale è asintomatico finché le sue dimensioni sono ridotte, questo porta spesso ad un diagnosi tardiva della patologia. L'utilizzo sempre più frequente di tecniche di diagnostica strumentale mediante analisi dell'immagine ha migliorato e aumentato la rilevazione del carcinoma renale in fase asintomatica, portando a significativi progressi nella diagnosi e stadiazione. Tuttavia la natura di alcune particolari lesioni renali cistiche e masse solide, anche benigne, non può essere distinta in maniera confidenziale con le sole tecniche di imaging; dunque risulta urgente la scoperta di nuove procedure diagnostiche e predittive per la ricerca di efficaci marcatori dell'RCC. I sintomi della presenza di carcinoma renale fanno parte della così detta triade classica e sono: ematuria, dolori lombari e presenza di una massa addominale alla palpazione; questi tre sintomi però si manifestano come triade solamente nel 10% dei casi. Spesso il sospetto della presenza di carcinoma renale è dato dalla presenza di segnali quali:

- colore anormale delle urine (dovuto alla presenza di piccole quantità di sangue)
- perdita di peso (circa 5% del peso corporeo) ed aspetto emaciato
- ingrossamento di un testicolo dovuto al blocco della vena gonadale e causato dall'invasione del tumore nella vena renale sinistra
- fenomeni paraneoplastici dovuti alla secrezione anomala di sostanze con attività ormonale.

Inoltre spesso si presentano sintomi dovuti a patologie metastatiche (ad esempio fratture patologiche dovute a metastasi alle ossa).

Data la mancanza di sintomi soprattutto nella fase iniziale della neoplasia, molto spesso questa viene diagnosticata in maniera quasi casuale tramite indagini all'addome (ad esempio la tomografia assistita dal computer o TAC) eseguite per propositi non correlati con il carcinoma renale. Oltre ad un corretto ed attento esame clinico, rivestono dunque un ruolo fondamentale le tecniche di diagnostica strumentale mediante analisi dell'immagine come l'ecografia e la tomografia computerizzata; tramite queste due tecniche il tumore viene studiato e monitorato.

L'ecografia permette di discriminare tra una massa solida (sintomo di una probabile neoplasia) ed una massa cistica; essa ha una sensibilità maggiore dell'85% nell'evidenziare i tumori di maggiori dimensioni, mentre solo del 60% circa per i piccoli tumori. La TAC permette, invece, di visualizzare accuratamente le masse di dimensioni ridotte e viene utilizzata anche per valutare l'eventuale estensione del tumore ad altri organi; essa consente di esaminare il volume della neoplasia, la sua localizzazione e la presenza di linfadenopatie. Inoltre, associando la TAC alla Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) è possibile ottenere una immagine tridimensionale della massa tumorale e quindi programmare in maniera ottimale l'eventuale intervento chirurgico. In seguito alla somministrazione di liquido di contrasto intravenoso (sia nella tomografia computerizzata oppure nelle immagini di risonanza magnetica), aumenterà il contrasto delle zone densamente irrorate (abbondante vascolarizzazione), mettendo in evidenza il tumore rispetto al parenchima normale.

L'arteriografia e la TAC sono equivalenti nel descrivere i rapporti con la vena renale, ma la tomografia computerizzata risulta la metodica migliore per dimostrare un interessamento linfonodale. Tutte e tre le strumentazioni diagnostiche (ecografia, TAC e RMN) forniscono informazioni adeguate sull'invasione della vena cava. In ogni caso, nessuna delle metodiche di immagine può essere considerata la migliore in assoluto per tutti i pazienti con carcinoma renale. Per questo motivo, le tecniche vengono spesso combinate per ottenere informazioni più complete, soprattutto quando si intende procedere all'asportazione di tumori di grandi dimensioni.

La biopsia percutanea non è una tecnica particolarmente usata a scopo diagnostico, perché la possibilità di una diagnosi errata e il rischio per il paziente di complicazioni mediche la rendono sfavorevole come metodica. Ad ogni modo, può essere effettuata a volte con l'ausilio dell'ecografia o della TC per guidare il campionamento del tessuto.

#### **1.2.2.8 Stadiazione**

In passato, il sistema di stadiazione più comunemente impiegato è stato quello di Flocks e Kadesky, modificato da Robson.

La classificazione di Robson (1964):

- *Stadio I*: il tumore confinato all'interno della capsula renale
- *Stadio II*: il tumore invade il tessuto adiposo perirenale, ma rimane confinato nella fascia di Gerota

- *Stadio III*: il carcinoma invade la vena renale e la vena cava inferiore (*IIIA*) e/o i linfonodi ilari (*IIIB*)
- *Stadio IV*: il tumore invade gli organi circostanti (tranne il surrene ) o metastasi a distanza.

Il sistema di stadiazione di Robson è semplice, ma raggruppa casi con prognosi e sopravvivenze diverse. I limiti di questo sistema diventano evidenti quando si nota che, la sopravvivenza dei pazienti con coinvolgimento linfonodale (*IIIB*) è decisamente inferiore rispetto ai pazienti stadio *IIIA* la cui prognosi e sopravvivenza non differisce di molto da quella degli stadi I o II.

La classificazione TNM del carcinoma renale, proposta e sostenuta a livello internazionale dall'Union Internationale Contre Cancer (UICC) a partire dal 1968, ha migliorato la stratificazione poiché distingue il coinvolgimento venoso da quello linfonodale, quantifica ognuno e, quindi, definisce meglio l'esatta estensione della malattia <sup>66</sup>. L'ultima versione di questa stadiazione risale al 2010 (7<sup>a</sup> edizione) quando l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) e l'UICC hanno condotto una revisione del sistema, basandosi sul livello a cui si manifesta il trombo tumorale, che differenziava lo stadio T dei tumori limitandosi al coinvolgimento della vena renale <sup>67,68</sup>. Il significato prognostico del coinvolgimento venoso e del livello della trombosi tumorale nei carcinomi renali è infatti fortemente studiato in quest'ultimi anni <sup>69</sup>.

La classificazione TNM delle neoplasie del rene:

### TUMORE PRIMITIVO (T)

*Tx* Tumore primitivo non definibile

*T0* Tumore primitivo non evidenziabile

*T1* Tumore della dimensione massima di 7 cm, confinato al rene

*T1a* Tumore ≤ 4 cm

*T1b* Tumore > 4 cm e < 7 cm

*T2* Tumore della dimensione massima oltre i 7 cm, confinato al rene

*T2a* Tumore > 7 cm e ≤ 10 cm, confinato al rene

*T2b* Tumore > 10 cm, confinato al rene

*T3* Tumore che invade le maggiori vene o i tessuti perinefrici, ma non la ghiandola surrenale ipsilaterale, e che non va oltre la fascia di Gerota

*T3a* Tumore che invade la vena renale e le sue ramificazioni o il tessuto perineale, ma che non va oltre la fascia di Gerota

*T3b* Tumore che invade macroscopicamente la vena cava al di sotto del diaframma

T3c Tumore che invade macroscopicamente la vena cava al di sopra del diaframma o la parete della vena cava

T4 Tumore che invade oltre la fascia di Gerota (includendo adiacente invasione della ghiandola surrenale ipsilaterale)

#### LINFONODI REGIONALI (N)

Nx Linfonodi regionali non valutabili

N0 Linfonodi regionali liberi da metastasi

N1 Metastasi in un singolo linfonodo regionale

N2 Metastasi in più linfonodi regionali

N3 Metastasi in un singolo linfonodo >5 cm (dimensione massima)

#### METASTASI A DISTANZA (M)

M0 Metastasi a distanza assenti

M1 Metastasi a distanza presenti

#### RAGGRUPPAMENTO IN STADI

STADIO I: T1,N0,M0

STADIO II: T2, N0, M0

STADIO III: T1, N1, M0-T2, N1, M0-T3, N0, N1, M0

STADIO IV: T4, N0, N1, M0-Ogni T, N2, M0-Ogni T, Ogni N, M1

Nella classificazione TNM, T si riferisce alle dimensioni del tumore primitivo, N indica lo stato dei linfonodi vicini al tumore e M la presenza di metastasi a distanza. La categoria T3 comprende le neoplasie che infiltrano la capsula e quelle che si estendono alla vena renale o cava; essa è suddivisa in tre sottocategorie (T3a, T3b e T3c). La stadiazione regionale può essere eseguita mediante la TAC, ma talvolta solamente l'anatomopatologo è in grado di definire con certezza l'esatta estensione locale e regionale di una neoplasia renale. La valutazione della presenza di metastasi a distanza è molto importante. Le metastasi ematogene del carcinoma renale possono interessare qualsiasi organo, ma le sedi più comuni sono il polmone, il fegato, le ossa, i tessuti sottocutanei ed il sistema nervoso centrale. Sembra pertanto ragionevole che una appropriata valutazione pre-operatoria comprenda un radiogramma standard del torace, gli esami di funzionalità epatica, la misurazione del calcio sierico, l'anamnesi e l'esame obiettivo.

### 1.2.2.9 *Prognosi*

Lo stadio di malattia, il diametro della neoplasia e il grado di differenziazione nucleare sono i fattori prognostici più importanti nel carcinoma a cellule renali. Negli ultimi anni sono stati suggeriti numerosi sistemi prognostici integrati. Fra questi i più importanti ed accurati sembrano essere lo UISS (University of California Los Angeles, Ucla Integrated Staging System), lo score SSIGN (Stage, Size, Grade and Necrosis) proposto dalla Mayo Clinic ed il nomogramma di Karakiewicz <sup>70-72</sup>. L'accuratezza prognostica di questi sistemi integrati è migliore rispetto a quella del solo TNM e raggiunge circa l'80%. Tuttavia l'applicazione di tali sistemi nella pratica clinica di routine è difficile, poichè il calcolo di uno score o l'assegnazione di un paziente ad una categoria di rischio attraverso una combinazione matematica di numerose variabili richiederebbe strumentazioni apposite, che non sono sempre facilmente disponibili e una maggior tempistica. Per questo motivo i sistemi integrati non sono ancora stati approvati nelle linee-guida e non sono raccomandati nella pratica clinica.

Dunque, lo stadio patologico è l'indice prognostico più importante e la sopravvivenza a 5 anni per lo stadio I varia tra 65-95%, per lo stadio II tra 45-85%, per lo stadio III tra 15-35% ed infine per lo stadio IV è inferiore a 10%.

Il tasso di sopravvivenza relativa a 5 anni è elevato per i pazienti con tumore localizzato < 4 cm (superiore a 94%), mentre è più basso nei pazienti con massa superiore ai 7 cm (tra 84 e 89%), indipendentemente dall'età del soggetto. Tuttavia gli esiti del carcinoma risultano significativamente peggiori con l'aumentare dell'età nei pazienti con tumore di media grandezza tra 4 e 7 cm; la sopravvivenza relativa a 5 anni è inferiore nei soggetti malati di età più avanzata (tra 50 e 79 anni) rispetto ai pazienti più giovani (tra 30 e 39 anni) <sup>73</sup>.

L'invasione della vena renale (IIIA) non ha effetti marcatamente negativi sulla prognosi, ma per i pazienti allo stadio IIIB (con invasione dei linfonodi regionali), la sopravvivenza a 5 anni scende radicalmente.

Pazienti con malattia metastatica che presentano ipercalcemia maligna hanno una cattiva prognosi; così come pazienti con metastasi linfonodali o con infiltrazione del tessuto adiposo perirenale hanno un quadro prognostico sfavorevole <sup>74</sup>. L'interessamento dei linfonodi regionali che drenano la linfa dal parenchima renale è un segno prognostico negativo che si associa ad una sopravvivenza a 5 anni dello 0-30%. L'estensione della disseminazione linfatica è senza dubbio molto importante e, solamente, i pazienti con un interessamento linfatico limitato sembrano



sopravvivere. La maggioranza degli studi mostra una miglior sopravvivenza in quei pazienti a cui sia stata diagnosticata una malattia metastatica e che presentano le seguenti condizioni:

- un lungo intervallo di tempo libero da malattia tra la nefrectomia e la comparsa di metastasi
- la presenza di metastasi solo polmonare
- buon performance status
- l'asportazione radicale del tumore primitivo.

Il grado di differenziazione nucleare è la caratteristica microscopica più importante che si correla, indipendentemente, con la sopravvivenza in tutti gli stadi delle neoplasie renali <sup>75</sup>. La classificazione più largamente impiegata del grado di differenziazione nucleare è quella di Fuhrman, che distingue 4 differenti categorie (Tabella 7)<sup>4</sup>.

<b>Grado 1</b>	Nuclei piccoli (10 mm circa), rotondeggianti, uniformi con nucleoli poco evidenti o assenti
<b>Grado 2</b>	Nuclei di medie dimensioni (15 mm circa) con contorno irregolare e nucleoli piccoli (visibili con l'ingrandimento X 400)
<b>Grado 3</b>	Nuclei voluminosi (20 mm circa) con marcate irregolarità del contorno e evidenti nucleoli
<b>Grado 4</b>	Come nel Grado 3 con l'aggiunta di nuclei bizzarri, spesso plurilobulati e con aggregati di cromatina

**Tabella 7.** Metodo di Fuhrman per la definizione del grado nucleare nell'adenocarcinoma renale <sup>4</sup>.

Questa classificazione stratifica la morfologia nucleare e la presenza di nucleoli da G1 (nucleo linfocita-simile) a G4 (voluminoso, atipico, polimorfo e con nucleoli evidenti).

Il tipo istologico non sembra essere un fattore prognostico affidabile, se si esclude l'adenocarcinoma renale con componente sarcomatoide che è caratterizzato da una prognosi particolarmente sfavorevole.

Nonostante tutte queste considerazioni non esistono ad oggi metodi così accurati da stratificare i pazienti in modo specifico a seconda della gravità della patologia. Per questo scopo risulta fondamentale la ricerca di nuove molecole che permettano di ottenere indicazioni più sicure sul decorso della patologia. Risultati piuttosto interessanti sono stati ottenuti studiando i livelli di trascrizione di due marcatori del tubulo prossimale del rene, l'aquaporina 1 (AQP1) e l'anidrasi carbonica 4 (CA4) <sup>76</sup>, in pazienti affetti da RCC; i risultati hanno riportato una evidente correlazione tra i

livelli di trascrizione genica di queste due proteine e la sopravvivenza a 5 anni dei pazienti.

#### **1.2.2.10 Strategie di intervento**

Fra tutti i tumori urologici il carcinoma renale risulta essere il più letale.

La resezione chirurgica (nephrectomia) radicale, attualmente, è l'unica terapia efficace per il trattamento del RCC localizzato<sup>77</sup>; essa consiste nell'asportazione del rene, del tessuto perirenale contenuto nella fascia di Gerota, del surrene e dei linfonodi loco-regionali. Nei casi in cui il tumore sia diffuso nella vena renale e nella vena cava inferiore è comunque possibile rimuovere chirurgicamente il tumore. Rimane in ogni caso l'opzione di una chirurgia conservativa nel caso di neoplasie di piccole dimensioni (diametro  $\leq 4$  cm) in sede periferica e che non coinvolgono la via escretrice, oppure in presenza di un unico rene la cui asportazione obbligherebbe ad una terapia dialitica.

Nei casi di tumori localizzati in cui il paziente non sia un buon candidato per una procedura chirurgica, è possibile ricorrere a terapie non invasive; queste consistono nella distruzione della massa tumorale tramite calore (ablazione mediante radiofrequenze) oppure crioterapia. Esse richiedono l'inserimento di una sonda nella pelle e nel tumore, il cui posizionamento viene monitorato utilizzando tecnologie di imaging in tempo reale (TC, ultrasuoni o RMN).

Per quanto riguarda chemioterapia e radioterapia, queste strategie terapeutiche danno purtroppo scarsi risultati in quanto questo tipo di tumore è sia radio che chemioresistente<sup>65</sup>; tale resistenza potrebbe essere dovuta alla presenza del gene MDR-1 (human multidrug resistant-1) nelle cellule di carcinoma renale. Questo gene, espresso anche in altre tipologie di cellule tumorali, codifica per una proteina di membrana, la glicoproteina P, che funziona da pompa per l'espulsione dalla cellula dei farmaci citotossici (compresi i chemioterapici).

Scarsi risultati, ottenuti solo nel 20-25% dei casi, derivano dall'immunoterapia con interferone-alfa e/o interleuchina-2<sup>78</sup> in associazione con vinblastina e/o floxuridina; da non sottovalutare anche il fatto che questi farmaci presentano molti effetti collaterali, che tuttavia possono essere ridotti diminuendo il dosaggio oppure somministrandoli per via sottocutanea. Nonostante la scarsità di risultati e gli effetti collaterali, attualmente l'interleuchina-2 risulta essere l'unica terapia approvata dalla FDA (Food and Drug Administration) per il trattamento dei casi di RCC con metastasi.

In aggiunta, non sono ancora conosciuti efficaci biomarcatori che possano consentire una diagnosi precoce del carcinoma renale e/o che permettano il monitoraggio continuo dell'evoluzione del tumore ed il follow-up dei pazienti; per la caratterizzazione di questa tipologia di tumore e la scoperta di eventuali biomarcatori, si stanno compiendo numerosi sforzi in diversi campi della ricerca (genetica molecolare, la citogenetica, l'immunoistochimica e la proteomica).

### **1.3 IL RENE NELLA MALATTIA SISTEMICA**

Le malattie glomerulari costituiscono uno dei problemi più gravi in nefrologia; i glomeruli possono subire lesioni da vari fattori nel corso di numerose malattie sistemiche. Molti processi sistemici mediati immunologicamente o di natura metabolica sono associati a danno glomerulare ed in alcuni di essi, ad esempio nel diabete mellito, questo coinvolgimento rappresenta una manifestazione clinica importante.

L'*insufficienza renale cronica (IRC)* è una malattia sistemica. Le due cause principali sono il diabete mellito e le nefropatie vascolari croniche. Una lesione renale cronica, a differenza del danno acuto in cui è possibile avere un recupero della funzionalità renale, spesso conduce a distruzione massiva irreversibile dei nefroni. A sua volta la riduzione della massa renale provoca un'iperplasia ed ipertrofia compensatoria dei nefroni residui; tale ipertrofia è un adattamento conseguente all'iperfiltrazione mediata dall'incremento di pressione e flusso nei capillari glomerulari. Tuttavia, col tempo, anche queste compensazioni diventano insufficienti, portando ad uno stato di sclerosi i glomeruli che presentano ancora una residua funzionalità. Tutte le nefropatie possono evolvere verso l'IRC: glomerulari, tubulo-interstiziali, vascolari e ostruttive. La glomerulonefrite è sempre stata in passato la più comune causa di insufficienza renale cronica; attualmente, in seguito ad una azione terapeutica più aggressiva delle glomerulonefrite, l'IRC è dovuto maggiormente a diabete mellito e ipertensione arteriosa<sup>79</sup>. La grave riduzione della massa di nefroni a livello renale conduce inevitabilmente a una perdita della funzionalità di tutti gli organi a livello sistemico. Il termine uremia indica lo stadio terminale dell'insufficienza renale e si riferisce all'accumulo nel sangue di sostanze azotate (urea e altri prodotti terminali del metabolismo) a causa dell'incapacità dei reni ad eliminarle. Il quadro clinico dell'uremia è comunque determinato anche da altri fattori, originati dal venir meno della funzionalità dei reni. Il rene infatti è un organo che interviene in numerosi processi fisiologici, dunque l'IRC è spesso accompagnato da alterato metabolismo di

elettroliti, dei carboidrati, dei grassi e delle proteine, anemia, malnutrizione e astenia. I segni e sintomi dell'uremia possono evidenziarsi a diversi livelli di insufficienza renale, secondo le modalità con cui essa progredisce; la loro gravità dipende da paziente a paziente in base alla velocità di riduzione della funzionalità renale. Ad una fase iniziale dell'IRC, in cui le funzioni essenziali renali sono ben compensate e mantenute, segue un periodo successivo con severa riduzione della *velocità di filtrazione glomerulare* (glomerular filtration rate, GFR, tra 29 e 15 ml/min) ed incremento delle concentrazioni ematiche di azoto; in questo momento iniziano a manifestarsi i primi sintomi dell'insufficienza renale, poliuria e ipertensione arteriosa. Quindi un'ostruzione o infezione delle vie urinarie, la disidratazione o la somministrazione di farmaci nefrotossici possono ulteriormente compromettere la funzionalità dei reni e condurre a uremia conclamata (GFR < 15 ml/min o paziente in terapia sostitutiva). Questa fase terminale o uremica dell'IRC è caratterizzata dalla perdita irreversibile di tutte le funzioni renali e richiede dunque un trattamento sostitutivo rappresentato da dialisi o trapianto renale.

Data la sua insorgenza lenta e graduale dovuta anche all'instaurarsi di meccanismi di adattamento, l'insufficienza renale cronica può pertanto non dare alcun sintomo fino agli stadi più avanzati. La diagnosi dell'IRC viene basata sulle alterazioni degli esami di laboratorio, che prevedono la misurazione dell'GFR espresso in millilitri al minuto che può essere stimato valutando la clearance della creatinina (*creatinine clearance*, CrCl); quest'ultima è eliminata dal rene in massima parte per filtrazione, perciò normalmente la sua clearance ha un valore molto simile a quello dell'GFR<sup>80</sup>. La clearance renale di una sostanza è definita come volume di plasma che viene "ripulito" da quella sostanza nell'unità di tempo ad opera del rene. La clearance della creatinina viene dosata nel sangue o nelle urine raccolte nelle 24 ore, e applicata successivamente la seguente formula:

$$\text{CrCl} = \frac{U \times V}{P}$$

dove U indica la concentrazione della creatinina nelle urine (mg/ml), V il volume delle urine (ml/min) e P la creatinina nel plasma (mg/ml). In un soggetto sano la clearance di creatinina è indicativamente compresa tra 95 e 140 ml/min per l'uomo e tra 85 e 130 ml/min per la donna. Valori inferiori sono indice di una funzionalità renale tanto più ridotta quanto minore è il valore di clearance.

In alternativa alla misurazione diretta urinaria, una stima della clearance della creatinina può essere ottenuta facilmente con formule matematiche che si basano sul valore della creatinemia e sui dati anagrafici e fisici del paziente (clearance stimata della creatinina o stima della filtrazione glomerulare); tra queste formule, le equazioni di Cockcroft-Gault e dello studio MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) sono quelle attualmente più in uso. La formula di Cockcroft-Gault è basata sull'età del paziente e sul valore di creatinina sierica, dove entrambi sono inversamente correlati con il GFR, e sul peso corporeo ideale. Questa equazione va moltiplicata per 0,85 nelle donne <sup>81</sup>. La formula dell'MDRD è più complessa ma fornisce una stima più accurata del GFR e anch'essa si basa su creatinemia, età, sesso, razza, albumina sierica e azoto ureico del paziente <sup>82</sup>.

Alcune malattie come il diabete mellito e l'ipertensione arteriosa predispongono all'insufficienza renale. I soggetti che ne sono affetti devono controllare frequentemente la loro funzione renale.

### **1.3.1 LA NEFROPATIA DIABETICA**

La nefropatia diabetica (ND) è la causa principale di insufficienza renale cronica e una delle cause principali di morbidità e mortalità correlate al diabete mellito (DM). Secondo la definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), il diabete mellito (DM) comprende un gruppo di disordini metabolici a diversa eziologia caratterizzati da iperglicemia cronica, associata ad alterazioni del metabolismo glucidico, lipidico e proteico, secondaria ad alterazioni della produzione/secrezione insulinica, della sua azione o entrambe <sup>83,84</sup>. Esistono diverse e distinte forme di DM causate da una complessa interazione di fattori genetici, ambientali e comportamentali (di stile di vita) <sup>85</sup>. Inoltre il DM induce nel tempo lo sviluppo progressivo di specifiche complicanze, tra le quali la nefropatia che può condurre ad insufficienza renale. I soggetti affetti da DM presentano un aumentato rischio di sviluppare patologie cardiovascolari, cerebrovascolari e vasculopatie periferiche. Infatti, la perdita consistente di proteine attraverso le urine (*proteinuria*) nei soggetti con DM è associata a marcata riduzione della sopravvivenza e aumentato rischio di malattia cardiovascolare <sup>86</sup>. La ND rappresenta una malattia in costante aumento, dato l'altissimo tasso di incidenza a livello mondiale della malattia diabetica; a tal proposito negli ultimi decenni, la ricerca si è focalizzata sullo studio dei meccanismi patologici alla base del danno renale dovuto a diabete mellito e quindi

sull'individuazione di marcatori predittivi indicativi di un aumentato rischio di nefropatia diabetica.

### **1.3.1.1 La malattia diabetica**

L'attuale classificazione dell'OMS e dell'American Diabetes Association (ADA) si basa sull'eziopatogenesi del DM e delle altre categorie di iperglicemia. Sebbene tutte le forme di DM siano caratterizzate da iperglicemia, i meccanismi patogenetici attraverso i quali insorge l'iperglicemia differiscono ampiamente. Alcune forme di DM sono caratterizzate da una completa carenza di insulina o da un difetto genetico che determina un'insufficiente secrezione insulinica, mentre altre tipologie presentano un'insulinoresistenza quale eziologia sottostante <sup>87</sup>. Le nuove modificazioni nella classificazione riflettono il tentativo di inquadrare il DM in base al processo patogenetico che conduce all'iperglicemia, invece che ai criteri dell'età d'esordio o del tipo di terapia <sup>85</sup>. L'OMS inoltre raccomanda di non proseguire nell'uso dei termini "diabete mellito insulinodipendente" e "diabete mellito non-insulinodipendente" e dei loro acronimi *IDDM* e *NIDDM*.

Le due ampie categorie del DM sono oggi denominate tipo 1 e tipo 2; da queste la nefropatia diabetica può svilupparsi come complicanza cronica vascolare.

Il diabete mellito di tipo 1 comprende la maggioranza dei casi con distruzione delle cellule  $\beta$  delle isole pancreatiche, grave insulinodeficienza e tendenza alla chetoacidosi <sup>87</sup>; in oltre il 90% dei casi si identificano processi autoimmuni (*tipo 1A*) mentre in meno del 10% dei casi l'eziologia e la patogenesi non sono note (*idiopatici* o *tipo 1B*). Il DM immunomediato di tipo 1 è il risultato di effetti sinergici di fattori genetici, ambientali e immunologici <sup>85</sup>. La distruzione autoimmune delle cellule  $\beta$  pancreatiche può avvenire in soggetti geneticamente suscettibili; questa suscettibilità è sicuramente poligenica e viene influenzata da geni situati nella regione del *sistema maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC)*. I geni principali che determinano la suscettibilità al DM di tipo 1A sono localizzati nella regione *HLA* del braccio corto del cromosoma 6. La capacità delle molecole MHC di classe II di presentare l'antigene dipende dalla composizione aminoacidica dei loro siti di presentazione dell'antigene. Sostituzioni aminoacidiche possono influenzare la specificità della risposta immunologica, alterando l'affinità di legame dei diversi antigeni per le molecole di classe II <sup>85</sup>. Tuttavia i polimorfismi all'interno del complesso HLA sembrano rendere conto solo del 40-50% del rischio genetico di sviluppare il DM di tipo 1A, per cui altri loci in altre parti del genoma sono coinvolti nella trasmissione genetica <sup>85</sup>. Tuttavia, solo una minoranza dei soggetti con suscettibilità genetica sviluppa il DM, per cui si

ipotizza che un evento precipitante di natura ambientale (virale, tossica, dietetica, ecc.) o mutazionale sia necessario per iniziare il processo autoimmune. L'identificazione di un evento scatenante ambientale risulta difficile in quanto l'evento può precedere l'insorgenza del DM di diversi anni <sup>85</sup>. Una volta persa la tolleranza immunitaria verso i componenti delle cellule  $\beta$ , il sistema immune produce autoanticorpi e linfociti T autoreattivi diretti contro antigeni insulari (insulina, glutammico-decarbossilasi, ecc.). Con il progredire della distruzione autoimmune e la conseguente riduzione di numero delle cellule  $\beta$  funzionanti, compaiono le prime alterazioni metaboliche: mancanza della pulsatilità della secrezione insulinica e perdita del picco precoce di secrezione insulinica in seguito a carico endovenoso di glucosio. Quando l'80-90% delle cellule  $\beta$  è distrutto, si assiste all'esordio clinico del DM. A questo punto esistono ancora cellule  $\beta$  residue funzionanti, ma sono in numero insufficiente per mantenere la tolleranza glucidica <sup>85</sup>. L'infiltrato delle insule pancreatiche è costituito da linfociti T CD4+ e CD8+, linfociti B, cellule NK e macrofagi. Il processo di infiltrazione è denominato insulite. Dopo che tutte le cellule  $\beta$  sono state distrutte, il processo infiammatorio si arresta, le insule diventano atrofiche e scompaiono i marker immunologici <sup>85</sup>. Gli *autoanticorpi antinsula pancreatica (islet cell autoantibodies, ICA)* possono precedere l'esordio clinico del DM di vari anni e, quando presenti, rappresentano un indice di rischio elevato (> 50%) di successiva comparsa di DM, soprattutto nei parenti di primo grado dei soggetti con DM di tipo 1. Attualmente gli ICA sono usati principalmente come strumento di ricerca e non nella pratica clinica, in parte a causa delle difficoltà tecniche del dosaggio, ma anche perché nessun trattamento si è dimostrato in grado di prevenire la comparsa o la progressione del DM di tipo 1A <sup>85</sup>. Anche gli *autoanticorpi antinsulina (IAA)* possono comparire in circolo prima dell'esordio clinico del DM e sono associati a un elevato rischio di malattia nei parenti di primo grado. Inoltre, diversi studi hanno indicato che alcune citochine possono ricoprire un ruolo importante nel processo autoimmune contro le cellule  $\beta$ . In particolare, l'interleuchina 1 (IL 1) possiede un effetto citotossico e selettivo sulle cellule  $\beta$ , potenziato da altre due citochine (TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) attraverso mediatori quali l'ossido nitrico e i radicali superossido.

Questa forma di diabete è caratterizzata da grave carenza di produzione insulinica; L'insulina è un ormone proteico secreto dalle cellule  $\beta$  delle insule pancreatiche. I granuli di secrezione maturi contengono insulina e peptide C in concentrazione equimolare e piccole quantità di proinsulina, che entrano in circolo. Poiché il peptide

C è meno suscettibile dell'insulina alla degradazione epatica, esso costituisce un utile marker della secrezione insulinica e permette di valutare la riserva funzionale delle cellule  $\beta$  all'esordio del diabete. Il peptide C circolante è totalmente assente nei pazienti con DM di tipo 1; questo conferma la severa insulinodeficienza, dunque tali soggetti devono essere trattati con insulina per tutta la vita.

Il diabete mellito di tipo 2, un tempo noto come diabete insulinoindipendente o dell'adulto, è un gruppo eterogeneo di disordini solitamente caratterizzati da gradi variabili di insulinoresistenza, alterata secrezione insulinica e aumentata produzione epatica di glucosio. In questa tipologia di DM, invece, la chetoacidosi è rara. I pazienti affetti da DM di tipo 2 all'esordio, e spesso anche per tutta la vita, non richiedono terapia insulinica. La malattia è a lenta evoluzione e in genere esordisce dopo i 40 anni di età. Questa forma di DM spesso non viene riconosciuta per anni in quanto l'iperglicemia è frequentemente asintomatica. Sebbene la specifica eziologia di questa forma di diabete non sia nota, non vi sono segni di distruzione autoimmune delle cellule  $\beta$ , né è associata a particolari antigeni HLA. Tuttavia, il DM di tipo 2 è caratterizzato da una forte predisposizione genetica; i geni principali responsabili di questo disordine non sono stati ancora identificati, ma è chiaro che la malattia è poligenica e multifattoriale. Nei soggetti con suscettibilità genetica a sviluppare DM di tipo 2, lo sviluppo della malattia è favorito da fattori ambientali, quali l'obesità, un elevato apporto calorico e la sedentarietà. L'obesità è presente in oltre l'80% dei pazienti. Essa si accompagna a insulinoresistenza e a iperinsulinismo compensatorio dell'iperglicemia. Tuttavia il DM non si sviluppa se alle aumentate richieste periferiche corrisponde un'adeguata secrezione di insulina. La ridotta capacità secretoria delle cellule  $\beta$  ha quindi un ruolo chiave nella patogenesi del DM di tipo 2. Le cause di questo declino della capacità secretiva insulinica non sono note; in ogni caso, l'ambiente metabolico potrebbe influire negativamente sulla funzione insulare (per esempio, l'iperglicemia cronica e l'aumento dei livelli di acidi grassi liberi)<sup>85</sup>. Si ipotizza quindi che, nel DM di tipo 2 siano alterati i meccanismi che regolano il trasporto e/o il metabolismo del glucosio nelle cellule  $\beta$ . Il problema è tuttavia aggravato dal fatto che l'iperglicemia di per sé può essere tossica per le cellule  $\beta$ . In ogni caso, nei pazienti con DM di tipo 2 l'iperglicemia non sopprime come di norma la secrezione di glucagone da parte delle cellule  $\alpha$ . I livelli di glucagone sono quindi elevati o anche normali, ma comunque sproporzionati ai livelli di insulina. In queste condizioni, la produzione epatica di glucosio, che fisiologicamente è inibita dall'insulina e stimolata dal glucagone, aumenta in modo proporzionale ai livelli



glicemici. Il glucosio prodotto in eccesso non viene infatti utilizzato dai tessuti periferici per l'insulinoresistenza e per la carenza di insulina. Se questa carenza di insulina è severa il DM è chiaramente sovrapponibile al DM di tipo 1.

### **1.3.1.2 Epidemiologia**

Negli ultimi due decenni si è assistito ad un drammatico aumento dei pazienti affetti da DM in tutto il mondo. Il diabete mellito, con le sue complicanze, costituisce uno dei maggiori problemi sanitari nei paesi economicamente sviluppati e la sua prevalenza è in continua crescita tanto da parlare di epidemia globale. La prevalenza mondiale di DM nei soggetti adulti (range di età tra 20 e 79 anni) è stata stimata essere nel 2010 del 6,4% con circa 280 milioni di persone affette da questa patologia; questi numeri tenderanno ad aumentare drasticamente sino a 7,7% e circa 440 milioni nel 2030. Tra il 2010 e il 2030 è stata riportata una stima del 69% di incremento nel numero di adulti colpiti da DM nei paesi in via di sviluppo e un 20% nei paesi industrializzati <sup>88</sup>. In Italia la percentuale di individui affetti da DM è mediamente del 3%.

Esiste tuttavia una considerevole variazione geografica nell'incidenza sia del DM di tipo 1 che del DM di tipo 2. La Scandinavia ha la più alta incidenza di DM di tipo 1 (in Finlandia, l'incidenza è di 30-40 casi/100000 per anno), mentre il Nord Europa e gli Stati Uniti condividono un'incidenza intermedia (8-17 casi/100000 per anno); Giappone e Cina presentano l'incidenza più bassa (1-3 casi/100000 per anno) <sup>89</sup>. La prevalenza del DM di tipo 2 è, invece, circa nove volte più elevata di quella relativa al DM di tipo 1, giustificando in parte il maggior contributo dei pazienti diabetici di tipo 2 sull'incidenza di stadio terminale della malattia renale (ESRD). Il tasso di sviluppo di ESRD è circa due volte maggiore negli afroamericani, negli ispanoamericani e nei nativi rispetto ai bianchi non ispanici; inoltre, l'insorgenza del DM di tipo 2 avviene, in media, a un'età più precoce nei primi due gruppi che nella popolazione bianca non ispanica. L'incidenza in questi gruppi etnici è in rapido aumento <sup>85</sup>. In generale, nel mondo, la prevalenza è più alta in certe isole del Pacifico, intermedia in paesi come l'India e gli Stati Uniti e relativamente bassa in Russia e Cina. Tale variabilità è probabilmente dovuta sia a fattori genetici che ambientali. Inoltre vi è una considerevole variabilità anche tra le diverse etnie all'interno di uno stesso paese.

Nei paesi economicamente sviluppati, la nefropatia diabetica è diventata oramai la principale causa di ESRD. Nel 2007, circa 110000 persone negli USA sono stati trattati per l'ESRD (dialisi o trapianto renale) <sup>90</sup>. Il 25-35% dei pazienti con DM di tipo 1 svilupperà nefropatia diabetica, con un'incidenza massima dopo circa 20 anni di

malattia, mentre solo il 10-20% dei pazienti con DM di tipo 2. La prevalenza della ND tra i pazienti diabetici è aumentata negli afroamericani, nei nativi americani, nei polinesiani, negli aborigeni australiani e negli indo-asiatici immigrati in Gran Bretagna rispetto alla popolazione caucasica. Il controllo glicemico e i fattori genetici sono molto importanti nella determinazione del rischio di sviluppare ND. Spesso la ND compare in pazienti diabetici nonostante il costante controllo della glicemia, invece a volte non è presente in soggetti con severa iperglicemia da anni. Dunque, oltre alla glicemia, anche altri fattori specialmente ereditari e ambientali contribuiscono allo sviluppo di questa complicanza. I pazienti diabetici di tipo 1 con parenti di primo grado affetti da diabete e nefropatia hanno un rischio di sviluppare la complicanza dell'83%; tale frequenza scende a 17% se questi soggetti hanno una parentela di primo grado solo con DM e non nefropatia <sup>91</sup>. Nel diabete mellito di tipo 2, un'influenza familiare è suggerita anche dal fatto che i livelli di escrezione urinaria di albumina sono più elevati nella progenie di soggetti diabetici con nefropatia. Il rischio è ancor più alto se la madre presentava iperglicemia durante la gravidanza, probabilmente perché questo causa una ridotta formazione dei nefroni come indicato in studi sperimentali <sup>92</sup>; dunque, il basso peso alla nascita e ridotta formazione dei nefroni sono associati a nefropatia, ma anche a ipertensione e sindrome metabolica. È stato ipotizzato che la minor formazione dei nefroni possa condurre ad una ipertrofia glomerulare compensatoria e un'aumentata velocità di filtrazione, peggiorando così il danno ai glomeruli se si verifica una patologia renale quale il diabete. Anche polimorfismi genetici possono contribuire allo sviluppo di DN; in un recente studio, è stata suggerita una predisposizione genetica, in pazienti con entrambe le tipologie di DM, dovuta ad un polimorfismo nel gene della carnosinasi 1, che sembra appunto essere collegato allo sviluppo della nefropatia diabetica grave <sup>93</sup>. In aggiunta ai fattori genetici, anche influenze ambientali (es. fumo di tabacco) possono promuovere la comparsa e progressione di DN, oltre che favorire le malattie cardiovascolari.

### **1.3.1.3 Patogenesi**

La nefropatia diabetica è una complicanza microvascolare del DM e la sua patogenesi è strettamente correlata all'iperglicemia cronica <sup>94</sup>.

Le complicanze croniche del DM sono responsabili della maggior parte della morbilità e della mortalità associate a questa malattia e possono essere suddivise in complicanze *vascolari* e *non vascolari*. Le complicanze vascolari sono classificate in *microangiopatiche* (per esempio, retinopatia, nefropatia e neuropatia, ecc.) e

*macroangiopatiche* (per esempio, coronaropatia, vasculopatia periferica, malattia cerebrovascolare, ecc.). Le prime coinvolgono i piccoli vasi, determinandone l'ispessimento della membrana basale. Le seconde coinvolgono i grossi vasi, con lesioni non distinguibili da quelle aterosclerotiche dei non diabetici. Queste alterazioni predispongono a un evento acuto cardiovascolare, che costituisce la causa di morte di circa l'80% dei diabetici (Figura 8).

Alterazioni emodinamiche: I meccanismi emodinamici sono coinvolti nella patogenesi della nefropatia diabetica; l'iperfiltrazione è comune nel primo periodo dopo la comparsa del DM e può essere corretta con uno stretto controllo glicemico <sup>95</sup>. L'incremento della velocità di filtrazione glomerulare è dovuto ad effetti dell'iperglicemia sulla dilatazione delle arteriole afferenti, attraverso mediatori vasoattivi tra cui il fattore di crescita insulino simile (insuline-like growth factor 1, IGF-1), l'ossido nitrico, prostaglandine e glucagone. In modelli sperimentali, l'iperfiltrazione è stata riportata come risultato della dilatazione dell'arteriola afferente con simultanea vasocostrizione efferente causando un aumento della pressione idrostatica glomerulare. Interventi terapeutici che riducono la pressione glomerulare, come diminuzione della pressione arteriosa sistemica, dieta lievemente ipoproteica, ACE-inibitori (angiotensin-converting enzyme, ACE) e inibizione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (vascular endothelial growth factor, VEGF), rallentano la proteinuria e il declino della funzione renale.

L'iperfiltrazione glomerulare altresì promuove direttamente l'accumulo di matrice extracellulare mediante processi che favoriscono l'azione del sistema renina-angiotensina e l'espressione del fattore di crescita trasformante  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF $\beta$ ) e della proteinchinasi C (PKC).

Ipertrofia renale: L'iperfiltrazione è associata a glomerulomegalia e organomegalia a carico dei reni. L'aumento di dimensione dei glomeruli è associato ad un incremento del numero di capillari funzionanti e di conseguenza della superficie glomerulare filtrante <sup>95</sup>. I cambiamenti nei glomeruli sono dovuti soprattutto ad ipertrofia, mentre le cellule epiteliali tubulari sono soggette ad una maggiore proliferazione e volume cellulare. L'ipertrofia renale può essere prevenuta mediante terapia insulinica intensiva e risultante normoglicemia. Elevati livelli di glucosio nel plasma sono responsabili di questo stato ipertrofico, attraverso la stimolazione di diversi fattori di crescita nel rene, tra cui IGF-1, fattore di crescita dell'epidermide (epidermal growth factor, EGF), fattore di crescita derivato dalle piastrine (platelet-derived growth factor, PDGF), VEGF e TGF $\beta$ . Quest'ultimo è aumentato nella nefropatia proliferativa

diabetica; sia il glucosio che i prodotti tardivi di glicosilazione o AGE (advanced glycosylated end-products) promuovono la sintesi di TGF $\beta$  in varie tipologie cellulari. Inoltre l'iperglicemia induce l'espressione di trombospondina, un potente attivatore del TGF $\beta$  latente.

Espansione mesangiale e formazione di noduli: L'espansione mesangiale è la tipica lesione della nefropatia diabetica, che segue l'accumulo di matrice extracellulare nella membrana basale glomerulare (MBG) e tubulare; con il passare del tempo tale espansione conduce allo sviluppo di una glomerulosclerosi diabetica nodulare (lesioni di Kimmelstiel-Wilson) o diffusa. La lesione mesangiale più precoce è caratterizzata da un aumento del numero di cellule del mesangio con deposito di componenti della matrice extracellulare, tra cui collagene di tipo IV e V, fibronectina e laminina <sup>95</sup>. Progressivamente, si verifica una generale perdita della cellularità mesangiale e formazione di grossi noduli di materiale amorfo, acidofilo e omogeneo, composti primariamente da collagene di tipo IV. Il numero di noduli presenti varia da glomerulo a glomerulo ed è in rapporto con lo stadio di evoluzione della malattia. L'aumento del mesangio è mediato sia dai livelli elevati di glucosio sia dagli AGE; quest'ultimi sono in grado di indurre disfunzione endoteliale e alterare la composizione e struttura della matrice extracellulare (MEC). Questi cambiamenti della matrice mesangiale possono essere ridotti con il costante controllo glicemico e l'utilizzo di inibitori della formazione dei prodotti di glicazione avanzati (es., aminoguanidina). Anche il TGF $\beta$  riveste un ruolo chiave nella determinazione delle lesioni mesangiali, poiché sembra stimolare la produzione della membrana basale di collagene e fibronectina da parte delle cellule mesangiali <sup>85</sup>; il TGF $\beta$  riduce anche la sintesi degli enzimi responsabili della degradazione della MEC e stimola l'azione inibitoria su di essi. L'angiotensina II stimola direttamente la sintesi di TGF $\beta$  nelle cellule epiteliali del mesangio e tubulari.

Proteinuria: La proteinuria è il principale fattore patogenetico responsabile della progressione della ND. Fisiologicamente, l'albumina e le proteine filtrate dal glomerulo sono riassorbite immediatamente dalle cellule del tubulo prossimale. Nella nefropatia diabetica, l'ispessimento della membrana basale glomerulare è associato ad un accumulo di collagene di tipo IV e una drastica riduzione di proteoglicani ricchi in eparansolfato carichi negativamente <sup>96</sup>. Tale combinazione contribuisce alla distruzione della struttura della MBG e delle sue proprietà di carica elettrostatica, conducendo ad un'alterata selettività delle proteine; la diminuzione di cariche elettriche negative sulla superficie della membrana favorisce il passaggio di albumina

nelle urine (proteinuria selettiva). Negli stadi più avanzati della ND, la struttura della membrana è, inoltre, talmente alterata dalla presenza di perforazioni che le proteine ad elevato peso molecolare (es., immunoglobuline G, macroglobuline) sono in grado di passare nel filtrato glomerulare (proteinuria non selettiva). Tuttavia, studi condotti sulla funzione dei podociti e della loro membrana, oltre che sulla loro interazione con le cellule intraglomerulari, hanno confermato il ruolo fondamentale di tali elementi nella comparsa di proteinuria<sup>97,98</sup>; i podociti prendono contatto con la MBG attraverso molecole di adesione, le integrine, specializzate nell'interazione con i componenti della membrana extracellulare e della MGB. Gli spazi tra le interdigitazioni, chiamati fessure di filtrazione, sono di larghezza uniforme e sono chiusi da un sottile diaframma elettrondenso. Ad esempio, tra le componenti proteiche del diaframma fenestrato dei podociti, interessate nel meccanismo della proteinuria, vi è la nefrina; poiché la nefrina presenta un dominio intracellulare ed uno extracellulare, si ritiene che le porzioni extra, originate su due processi pedicellari affiancati, stabiliscano interazioni omofile permettendo una stretta connessione tra i podociti. L'insufficiente quantità di nefrina si riscontra nei pazienti affetti da nefropatia diabetica e può essere risolta con la somministrazione di antagonisti dei recettori dell'angiotensina (angiotensin receptor blockers, ARBs)<sup>99-101</sup>. Dunque, studi sperimentali e su biopsie umane hanno evidenziato come la ND sia caratterizzata da una perdita progressiva dei podociti ed aumento di spessore dei pedicelli<sup>100-102</sup>.

Fibrosi tubulo-interstiziale: I due cambiamenti più importanti a livello strutturale, che correlano con la progressione della ND, sono il grado di espansione mesangiale e la severità della malattia tubulo-interstiziale. I meccanismi attraverso i quali la fibrosi tubulo-interstiziale si sviluppa, in associazione con il danno glomerulare, sono la produzione di citochine prosclerotiche sia a livello glomerulare che tubulointerstiziale, il rilascio di fattori di crescita (soprattutto TGF $\beta$ ), l'aumentata filtrazione di albumina a livello glomerulare e gli effetti diretti e indiretti della proteinuria. L'eccessivo riassorbimento di proteine a livello del tubulo prossimale porta ad una infiammazione peritubulare e fibrosi, un'ischemia renale ed ipossia indotte da progressiva ialinosi delle arteriole afferenti ed efferenti e rarefazione dei capillari peritubulari<sup>103,104</sup>.

Iperglicemia: Il rischio di complicanze croniche aumenta in funzione della durata dell'iperglicemia; di solito diventano manifeste nella seconda decade di iperglicemia. I meccanismi attraverso i quali l'iperglicemia cronica determina la malattia renale sono i seguenti: interazione di fattori solubili (fattori di crescita, angiotensina II, endotelina, AGE), alterazioni emodinamiche nel microcircolo renale (iperfiltrazione

glomerulare, aumentata pressione idrostatica transcapillare glomerulare) e modificazioni strutturali nel glomerulo (aumento della matrice extracellulare, ispessimento della membrana basale, espansione mesangiale, fibrosi)<sup>105</sup>.

Nel dettaglio, attualmente vengono proposte tre ipotesi patogenetiche alla base delle complicanze microangiopatiche, non mutuamente esclusive e che coinvolgono:

- 1) la via dei polioli
- 2) la glicazione non-enzimatica
- 3) lo stress ossidativo.
- 4) attivazione di isoforme della proteinchinasi C (PKC) e fattori di crescita.

Il glucosio intracellulare è prevalentemente metabolizzato attraverso la fosforilazione e la successiva glicolisi, ma, secondo la prima ipotesi, quando il glucosio nelle cellule è aumentato viene convertito dall'enzima aldoso-reduttasi in sorbitolo, utilizzando come donatore di H<sup>+</sup> il NADPH. Il sorbitolo, a sua volta, è trasformato dall'enzima sorbitolo-deidrogenasi, usando il NAD<sup>+</sup> come accettore di H<sup>+</sup>, in fruttosio. L'eccessiva attivazione di questa via aumenta l'osmolalità intracellulare e altera il metabolismo del mioinositolo e del potenziale redox portando a disfunzione cellulare.

L'iperglicemia cronica può condurre a glicazione non-enzimatica di aminoacidi e proteine (reazione di Maillard). Nella glicazione non-enzimatica, il glucosio si lega reversibilmente al gruppo aminico di una proteina dando origine ad una "base di Schiff", il cui successivo riarrangiamento più stabile forma un "composto di Amadori"; nel tempo, questi prodotti precoci subiscono lente e complesse modificazioni che determinano la formazione di prodotti irreversibili tardivi di glicosilazione o AGEs (advanced glycosylated end-products)<sup>106,107</sup>. Fino ad ora sono stati identificati almeno tre prodotti diversi: pentosidina, pirralina e carbossimetilisina. Sia le proteine circolanti che tissutali, oltre che lipidi e acidi nucleici, sono quindi glicate. Un classico esempio è l'emoglobina (Hb), che inizialmente forma emoglobina glicata (HbA1c), per poi generare come prodotto ultimo l'Hb-AGE. Gli AGE si depositano nei tessuti e inducono alterazioni analoghe a quelle riscontrate nelle complicanze tardive del diabete. Gli AGE sono in grado di formare legami crociati tra le proteine, accelerare l'aterosclerosi, promuovere la disfunzione glomerulare, ridurre la sintesi di ossido nitrico, indurre disfunzione endoteliale e alterare la composizione e struttura della matrice extracellulare. Tra i vari siti di legame degli AGE, il più importante è il recettore RAGE (receptor for AGE)<sup>108</sup>, presente sulla superficie di molti tipi cellulari, ma è particolarmente abbondante nelle cellule endoteliali tubulari di pazienti diabetici. RAGE funziona come molecola in grado di trasdurre il segnale all'interno

della cellula; una delle sue principali azioni è l'attivazione del fattore di trascrizione nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B), che regola l'espressione di molecole infiammatorie. Il livello sierico degli AGE è correlato ai livelli di glicemia e questi prodotti si accumulano non appena la velocità di filtrazione glomerulare diminuisce<sup>85</sup>. Dunque la concentrazione di AGE è aumentata nel siero di pazienti diabetici con nefropatia.

L'osservazione che le proteine glicate, durante il loro riarrangiamento ad AGE, liberano radicali superossido ha suggerito una teoria unificante le due precedenti. La riduzione dei potenziali redox intracellulari, conseguente all'attivazione della via dei polioli, rende le cellule più suscettibili all'attacco dei radicali liberi, mentre la loro produzione sarebbe legata alla reazione di glicazione non-enzimatica. I radicali superossido sono prodotti anche dall'autossidazione del glucosio, che a sua volta contribuisce a formare proteine glicate.

Infine, un'altra ipotesi postula che l'iperglicemia aumenti la formazione del diacilglicerolo, inducendo l'attivazione di alcune isoforme della protein chinasi C (PKC) che, a loro volta, modulano una varietà di eventi cellulari. Questa famiglia di proteine chinasi comprende 12 sottotipi di PKC, che regolano diverse funzioni vascolari, tra cui contrattilità, flusso sanguigno, proliferazione cellulare e permeabilità vascolare. L'attivazione della PKC da parte del glucosio altera, per esempio, nelle cellule endoteliali e nei neuroni in vitro, la trascrizione dei geni della fibronectina, del collagene di tipo IV, delle proteine contrattili e delle proteine della matrice extracellulare. I fattori di crescita sembrano, inoltre, svolgere un ruolo importante nelle complicanze legate al diabete. Il fattore di crescita trasformante  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF $\beta$ ) è aumentato nella nefropatia proliferativa diabetica.

Sistema renina-angiotensina: È ormai noto che vi sia un forte coinvolgimento del sistema renina-angiotensina (renin-angiotensin system, RAS) nella patogenesi della ND. La renina è un enzima proteolitico, che è secreto dalle cellule iuxtaglomerulari del rene, deputato all'attivazione del processo che trasforma l'angiotensinogeno in angiotensina che a sua volta viene convertita nella sua forma biologicamente attiva, l'angiotensina II. L'attività dell'enzima renina a livello plasmatico è ridotta, anche se dovrebbe essere elevata a seguito dell'aumentato volume extracellulare e concentrazione di sodio che caratterizzano la nefropatia diabetica. Questo ha suggerito la possibilità che l'attivazione renale del RAS rivesta un importante ruolo nello sviluppo della ND. Siti di attivazione locale del RAS sono stati identificati a livello dei glomeruli e dei vasi renali. È stata dimostrata la presenza di specifici recettori prorenina/renina nel rene<sup>109</sup>; il legame della prorenina al recettore

determina la sua attivazione non-enzimatica a renina, che localmente produce angiotensina II <sup>110</sup>. L'angiotensina II esercita numerosi effetti a livello renale, sia emodinamici che non; per quanto riguarda gli effetti emodinamici, favorisce la proteinuria e induce vasocostrizione arteriolare, con conseguente aumento della pressione sistemica e glomerulare. Allo stesso tempo, stimola la proliferazione cellulare, l'ipertrofia, l'espansione della matrice e la sintesi di citochine (TGF $\beta$ ). È ormai noto che i farmaci anti-ipertensivi, capaci di ridurre l'attività del sistema renina-angiotensina, sono in grado di rallentare la progressione della nefropatia diabetica, esercitando nel contempo un effetto protettivo sul cuore. Gli ACE-inibitori e gli antagonisti recettoriali dell'angiotensina II (angiotensin II receptor blockers, ARBs) vengono utilizzati normalmente per limitare la produzione di tale ormone e bloccarne la sua azione; numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia di tali farmaci nel ridurre la progressione a macroalbuminuria e nel ritardare l'evoluzione della nefropatia diabetica con proteinuria verso l'insufficienza renale. Sia gli ACE-inibitori sia gli antagonisti recettoriali dell'angiotensina esplicano il loro effetto normalizzando la pressione arteriosa, ma anche esercitando un'azione diretta a livello renale dove modificano positivamente l'emodinamica glomerulare (diminuiscono la pressione di filtrazione) e riducono la permeabilità del filtro glomerulare (di conseguenza quindi la proteinuria). Nella nefropatia associata a ipertensione arteriosa è inoltre indicata l'associazione di più farmaci: calcio-antagonisti, bloccanti, e diuretici sono impiegati in associazione agli ACE-inibitori e agli antagonisti dell'angiotensina.

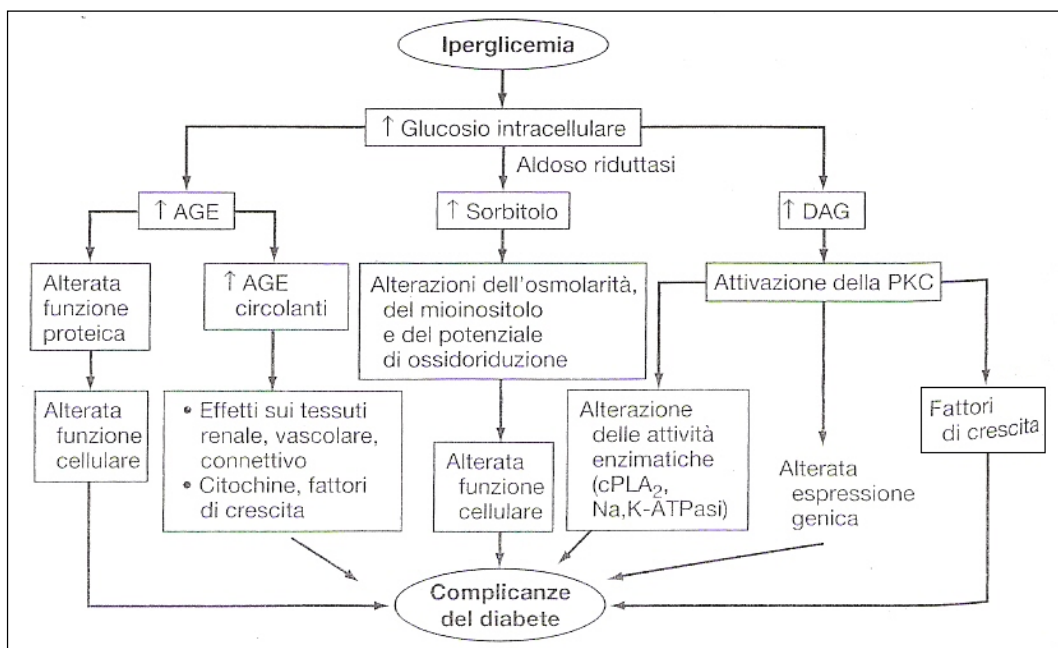
Maggior attenzione è stata focalizzata, recentemente, sul ruolo dell'aldosterone. Questo ormone accelera la progressione del danno renale in modelli sperimentali indipendentemente dall'angiotensina II <sup>111</sup>. Queste evidenze iniziali sono state confermate dalla dimostrazione della presenza di un sistema di produzione locale di aldosterone a livello renale e di recettori per i mineralcorticoidi (mineralcorticoid receptor, MR) in altre sedi del parenchima renale e lungo il tubulo distale, dove l'aldosterone regola il riassorbimento di sodio e la secrezione di potassio <sup>112</sup>. I meccanismi molecolari coinvolti nell'azione lesiva dell'aldosterone a livello dei reni non sono ancora ben chiare, ma probabilmente riguardano l'induzione di specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen species, ROS) e l'aumento di espressione di agenti infiammatori <sup>113,114</sup>. Nella ND, l'aldosterone è correlato allo sviluppo e incremento della proteinuria, oltre che ad un'importante azione profibrotica.

Predisposizione genetica: Un ruolo importante riveste, anche, la predisposizione genetica, come determinante del rischio di sviluppare nefropatia in pazienti con DM



di tipo 1 e 2. Pazienti diabetici con una storia familiare di ipertensione o malattie cardiovascolari presentano un rischio di nefropatia più elevato, evidenziando quindi il legame della sua patogenesi con fattori che promuovono l'aterosclerosi.

Fattori ambientali: Alla base di questa complicanza del DM esistono inoltre numerosi fattori ambientali; tra questi il fumo accelera il declino della funzione renale <sup>115</sup> e aumenta lo stress ossidativo, anche a carico delle cellule dell'endotelio vasale, provocando la comparsa e l'aggravarsi dell'aterosclerosi.



**Figura 8.** Possibili meccanismi molecolari delle complicanze legate al diabete. AGE, prodotti terminali di glicosilazioni avanzata; PKC, proteinchinasi C; DAG, diacilglicerolo; cPLA<sub>2</sub>, fosfolipasi A<sub>2</sub>; Na,K-ATPasi, ATPasi sodio-potassio.

### 1.3.1.4 Decorso clinico

La progressione del danno renale nei pazienti con DM può essere suddivisa in cinque stadi <sup>116</sup>. È importante comunque sottolineare che questa stadiazione è un modello generale e l'evoluzione della nefropatia diabetica è altamente variabile, spesso non lineare; tale schema è valido soprattutto per il diabete mellito di tipo 1, mentre è meno attendibile nella malattia diabetica di tipo 2. L'espressione e la natura di queste fasi cliniche possono essere influenzate da complesse interazioni di fattori genetici, ambientali e terapeutici, che quindi modificano fortemente il profilo della malattia.

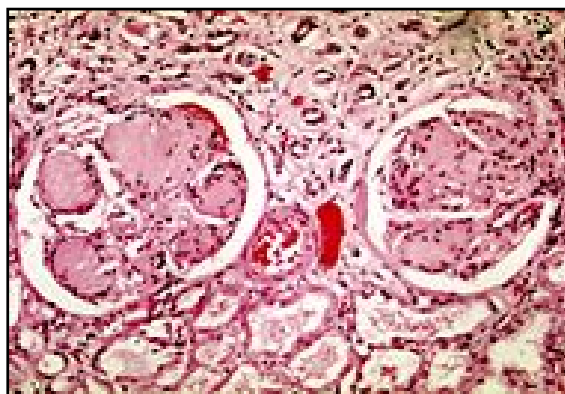
L'iperperfusion glomerulare e l'ipertrofia renale avvengono nel primo periodo subito dopo l'insorgenza del DM e si riflettono in un incremento della velocità di filtrazione glomerulare (*stadio 1*); tali cambiamenti sono osservati soprattutto in pazienti

diabetici di tipo 1 e in percentuale più bassa nei diabetici di tipo 2. A questo stadio i pazienti a rischio o meno di sviluppare nefropatia diabetica non possono ancora essere chiaramente distinti. Durante i primi 5 anni di DM, l'ispessimento della membrana basale del glomerulo, l'ipertrofia glomerulare e l'espansione del volume mesangiale si verificano non appena il GFR ritorna nella norma a seguito dell'inizio della terapia insulinica. Tuttavia, dopo 5-10 anni di DM di tipo 1, circa il 40% degli individui inizia ad eliminare piccole quantità di albumina con le urine (microalbuminuria) (*stadio 2*). La *microalbuminuria* è definita da 30 a 300 mg/die di albumina nella raccolta di urine delle 24 ore o da 30 a 300 µg/mg di creatinina in un campione di urine. Segue poi una progressione verso la proteinuria grave (> 300 mg/die) (*stadio 3*). In alcuni pazienti inoltre possono essere rilevati livelli aumentati di colesterolo, fibrinogeno, fattore di von Willebrand (vWF) e prorenina. Una volta che è presente grave proteinuria, si verifica un declino stabile nel GFR, un'ipertensione arteriosa ed un incremento graduale di azotemia e creatininemia (*stadio 4*). Dunque, circa il 50% degli individui con ormai una glomerulosclerosi generalizzata raggiunge poi lo stadio terminale della malattia renale (ESRD) in 7-10 anni dallo sviluppo di proteinuria (*stadio 5*). Nel DM di tipo 2, invece, il 20-40% dei soggetti con microalbuminuria progredisce verso una grave nefropatia e di questi solo il 20% dopo 20 anni raggiunge lo stadio terminale della malattia renale <sup>86</sup>. La microalbuminuria o la nefropatia manifesta possono essere presenti al momento della diagnosi del DM di tipo 2, indicando il suo lungo periodo asintomatico, e spesso sono accompagnate da ipertensione; in ogni caso, il legame tra ipertensione e nefropatia è molto meno stretto in questa forma diabetica rispetto al tipo 1 <sup>117</sup>. La microalbuminuria nel DM di tipo 2 può essere secondaria anche a fattori non correlati al DM, come lo scompenso cardiaco, l'ipertensione, la malattia prostatica o le infezioni <sup>94</sup>. Inoltre, diverse complicanze extra-renali accompagnano la nefropatia diabetica; la retinopatia diabetica, ad esempio, è presente in quasi tutti i pazienti con DM di tipo 1 e nefropatia, mentre solo il 50-60% dei pazienti diabetici di tipo 2 ne soffre <sup>118</sup>.

#### **1.3.1.5 Patologia dei reni**

A seguito dell'insorgenza del diabete mellito, i reni aumentano di peso in media del 15% e così anche le loro dimensioni progressivamente si accrescono fino alla comparsa di uno stato di nefropatia. Nella maggior parte dei pazienti diabetici di tipo 1, è presente un sostanziale incremento del volume glomerulare e dei rispettivi glomeruli. Questi cambiamenti sono accompagnati da un'ipertrofia dell'interstizio.

In pazienti con DM da oltre 10 anni, indipendentemente dalla presenza di nefropatia, lo spessore della membrana basale glomerulare risulta aumentato fino a tre volte il normale range 270-359 nm; in una condizione di ND avanzata, lo spessore della MBG e il volume della frazione mesangiale sono strettamente correlati con l'escrezione urinaria di albumina (*albumin excretion rate*, AER)<sup>117</sup>. Sono caratteristiche inoltre lesioni di glomerulosclerosi intercapillare diffusa o nodulare (Figura 9).



**Figura 9.** Nefropatia diabetica. Glomerulosclerosi con notevole proliferazione mesangiale (Immagine tratta da [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

La *glomerulosclerosi diffusa*, descritta per la prima volta da Fahr nel 1942 e successivamente da Laipply nel 1944, si riscontra più frequentemente e più precocemente della forma nodulare con un'incidenza superiore al 90% per i pazienti diabetici di tipo 1 da oltre 10 anni e tra il 25-50%, invece, nei pazienti con DM di tipo 2<sup>117</sup>; essa consiste nella presenza, sia nel mesangio che nella parete delle anse capillari, di un abbondante materiale ialino, iperacidofilo e PAS-positivo. Tale materiale tende ad aumentare progressivamente determinando l'ispessimento e la compressione delle anse glomerulari, fino al restringimento del lume con riduzione della portata plasmatica renale e del filtrato glomerulare<sup>119</sup>. La *glomerulosclerosi intercapillare nodulare*, descritta nel 1936 da Kimmelstiel e Wilson, è meno frequente e molto più specifica; le lesioni nodulari sono caratterizzate dalla presenza, nella regione centrale dei lobuli glomerulari periferici, di un accumulo di materiale eosinofilo e PAS-positivo con struttura laminata e nel quale si osservano scarse cellule mesangiali. Essi inoltre possono contenere nuclei picnotici. Alla periferia dei noduli, i capillari glomerulari sono ectasici e disposti a corona. Il numero di noduli varia da glomerulo a glomerulo ed è correlato al grado di evoluzione della malattia; negli stadi avanzati sono presenti in gran numero e tendono ad ingrossarsi a seguito

del continuo accumulo di materiale <sup>119</sup>. Come suggerito da Bloodworth in un suo studio <sup>120</sup>, che i noduli trarrebbero origine dall'organizzazione di microaneurismi che si formano nelle anse glomerulari dalla rottura dei punti di connessione tra membrana basale dei capillari e mesangio.

Da sottolineare inoltre la presenza di una marcata ialinosi delle arteriole afferenti ed efferenti come anche arteriosclerosi. Possono essere presenti fibrosi interstiziale e atrofia tubulare.

#### **1.3.1.6 Diagnosi e screening**

Le principali procedure diagnostiche per stabilire uno stato di nefropatia diabetica includono <sup>117</sup>:

- determinazione della proteinuria o albuminuria;
- misurazione della pressione sanguigna;
- misurazione della concentrazione di creatinina sierica e del GFR;
- esame oftalmologico.

La diagnosi di nefropatia diabetica è solitamente basata sulla presenza di proteinuria massiva (> 0,5 g/ 24h) in pazienti con diabete a lungo termine (superiore ai 10 anni) e senza indicazioni di altre forme di malattia renale <sup>121</sup>. La comparsa di proteinuria è spesso associata a ipertensione e declino nel GFR. Il livello di proteinuria è fortemente correlato al grado di severità delle lesioni glomerulari <sup>79</sup>. In pazienti con DM di tipo 1 a lungo termine, in particolare se è anche presente una retinopatia, non risulta necessaria la biopsia renale, poiché alcuni studi hanno dimostrato che circa il 95% di questi pazienti svilupperà nefropatia diabetica. La biopsia renale è invece chiaramente indicativa in un decorso clinico atipico (es., quando la comparsa di malattia renale avviene entro i primi 10 anni di DM, se vi è un rapido progressivo declino della funzionalità renale, se è presente un'ematuria macroscopica o se è visibile un sedimento urinario di acantociti e cilindri ematici <sup>117</sup>). In questi casi, è più probabile che si verifichino altre forme di nefropatia e quindi tali pazienti richiedono una più accurata e specifica conferma della diagnosi. Allo stesso modo, anche i pazienti diabetici di tipo 2 con proteinuria massiva e retinopatia hanno una probabilità elevata di sviluppare nefropatia diabetica. Tuttavia, essendo il DM di tipo 2 asintomatico per un lungo periodo e la retinopatia poco frequente, per tale forma esiste una maggiore incertezza diagnostica. In questi pazienti, la biopsia renale è fondamentale e utile a rilevare modificazioni renali minori o forme atipiche di danno renale indotto da diabete o, ancora, altre malattie renali.

Negli anni precedenti alla comparsa di proteinuria è comunque possibile rilevare la quantità di albumina presente nelle urine mediante test di dosaggio altamente sensibili; rispetto ai soggetti normoalbuminurici, i pazienti con microalbuminuria hanno un rischio aumentato di tre/quattro volte di sviluppare proteinuria e ESDR.

In dettaglio, la National Kidney Foundation e l'American Diabetes Association (ADA) raccomandano che i pazienti con DM di tipo 1 da più di 5 anni e tutti i pazienti diabetici di tipo 2 siano sottoposti a dosaggio della proteinuria (dipstick) e, se quest'ultima non fosse presente, a misurazione della microalbuminuria. Quest'ultima raramente compare nel paziente diabetico di tipo 1 di breve durata o in età prepubere; mentre a causa della difficoltà di datare con precisione l'insorgenza del DM di tipo 2, in questi pazienti lo screening dell'albuminuria dovrebbe iniziare già al momento della diagnosi<sup>87</sup>. La microalbuminuria è a tutt'oggi il più semplice e sensibile parametro per rilevare il rischio di nefropatia nel diabete mellito<sup>122</sup>; il suo dosaggio viene eseguito mediante misurazione del rapporto albumina-creatinina in una raccolta di urine random, su urine delle 24 ore o su raccolta urinaria temporizzata (es., overnight). Quest'ultimo metodo permette di ottenere informazioni più accurate ed è maggiormente accettato dai pazienti in quanto più semplice da eseguirsi. L'escrezione urinaria di albumina tende ad essere almeno del 25% più alta durante il giorno rispetto alla notte e, soprattutto, presenta una variabilità biologica intra-individuale del 30-50%<sup>123</sup>. Inoltre a causa della instabilità inter-giornaliera dell'escrezione urinaria dell'albumina, almeno due di tre raccolte eseguite in un periodo di 3-6 mesi devono fornire risultati positivi per poter diagnosticare microalbuminuria nel singolo individuo (Tabella 8)<sup>124</sup>.

#### **CATEGORIES OF URINARY ALBUMIN EXCRETION**

<b>CATEGORY</b>	<b>TIMED COLLECTION (µg/min)</b>	<b>24-hr COLLECTION (mq/24 hr)</b>	<b>SPOT COLLECTION (µg/mg creatinine)</b>
Normoalbuminuria	< 20	< 30	< 30
Microalbuminuria	20 - 200	30 - 300	30 - 300
Proteinuria	> 200	> 300	> 300

**Tabella 8.** Valori di escrezione urinaria di albumina<sup>124</sup>.

È importante sottolineare che l'AER può subire variazioni transitorie in presenza di evidente iperglicemia, infezioni delle vie urinarie, stati febbrili, grave ipertensione e scompenso cardiaco<sup>125</sup>. Tuttavia è da considerare che una minoranza dei pazienti diabetici, specialmente donne, presentano riduzione del GFR ed ipertensione come

prima manifestazione clinica di marcate lesioni renali. Dunque, tutti i pazienti con DM dovrebbero prestare attenzione e ripetere costantemente la misurazione della pressione sanguigna e ai soggetti normoalbuminurici con retinopatia diabetica o aumentati livelli pressori è raccomandato sottoporsi ad ulteriore determinazione del GFR. Il ritmo circadiano della pressione arteriosa tende ad essere anormale negli stadi iniziali della malattia diabetica <sup>126</sup> e non è raro da riscontrare perfino un incremento della pressione arteriosa notturna; nei pazienti diabetici con ND, questo aumento notturno è associato in modo indipendente ad una mortalità venti volte più elevata e un maggior rischio di danno renale <sup>127</sup>.

L'albuminuria, oltre a rappresentare la manifestazione più precoce di nefropatia, è anche un marker di aumentata morbilità e mortalità cardiovascolare nel diabete mellito. Così, la comparsa della microalbuminuria rappresenta inoltre una forte indicazione allo screening di possibili patologie vascolari e suggerisce la necessità di interventi terapeutici mirati a ridurre tutti i fattori di rischio cardiovascolare (per esempio, riduzione del colesterolo LDL, terapia antiipertensiva, interruzione del fumo, aumento di attività fisica, etc) <sup>123</sup>.

È importante inoltre sottolineare che i pazienti diabetici con nefropatia sono particolarmente inclini a sviluppare danno renale acuto dopo somministrazione di farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) o di radiocontrasto; il rischio può essere ridotto considerevolmente mediante somministrazione di fluidi, oltre che temporanea sospensione di diuretici e possibilmente ACE-inibitori. Per diminuire il rischio da radiocontrasto, è stato proposto di aggiustare la dose somministrata in proporzione alla riduzione della funzione renale.

#### **1.3.1.7 Terapia**

La terapia ottimale per la nefropatia diabetica è la prevenzione, per cui la microalbuminuria dovrebbe essere identificata in uno stadio precoce. Numerosi studi, infatti, hanno dimostrato che l'insorgenza e la progressione della nefropatia diabetica possono essere significativamente migliorate da misure di intervento, la cui efficacia risulta più elevata se attuate ad uno stadio molto precoce dello sviluppo della complicanza <sup>128</sup>.

In generale, gli interventi efficaci nel rallentare la progressione della microalbuminuria verso la nefropatia manifesta comprendono:

- normalizzazione della glicemia;
- stretto controllo pressorio;
- somministrazione di ACE-inibitori <sup>129</sup>.

Controllo glicemico: Un migliore controllo glicemico riduce la velocità con la quale la microalbuminuria compare e progredisce sia nel DM di tipo 1 che nel DM di tipo 2. Il mantenimento dei livelli glicemici ottimali nei pazienti con DM di tipo 1, ottenuto mediante controllo intensivo, è in grado di ritardare significativamente l'insorgenza e di rallentare la progressione delle complicanze. Il controllo intensivo può ridurre anche le complicanze del DM di tipo 2<sup>94</sup>. Studi clinici controllati e randomizzati hanno dimostrato l'efficacia nel DM di tipo 1 della terapia insulinica intensiva, che prevede tre o più iniezioni giornaliere o l'utilizzo di una pompa insulinica<sup>130</sup>. Lo schema intensivo è risultato ottimale anche per i pazienti con DM di tipo 2 e carenza insulinica. La terapia intensiva e il buon controllo glicemico sono importanti anche in corso di malattie acute intercorrenti, quali infezioni severe, ischemia cerebrale, periodi perioperatori. Per ogni paziente la terapia deve essere individualizzata per garantire il raggiungimento e il mantenimento degli obiettivi glicemici previsti e ridurre la frequenza degli effetti collaterali e delle reazioni avverse. Pertanto i pazienti necessitano di programmi terapeutico-educazionali, attuati da un gruppo coordinato di specifiche figure professionali sanitarie<sup>87</sup>. Questi programmi prevedono:

- 1) Appropriata frequenza di automonitoraggio della glicemia (self-monitoring of blood glucose, SMBG) o utilizzo di sistemi di monitoraggio continuo del glucosio (continuous glucose monitoring, CGM);
- 2) Verifica periodica degli obiettivi terapeutici e valutazione dei livelli di emoglobina glicata (HbA1c).
- 3) Terapia medica nutrizionale (TMN);
- 4) Attività fisica regolare;
- 5) Regimi di somministrazione insulinica di tipo fisiologico, cioè iniezioni giornaliere multiple di analoghi dell'insulina ad azione ultrarapida (per esempio, *lispro*), di insulina ad azione rapida (per esempio, *regolare*), ad azione intermedia (per esempio, *NPH* o *lenta*) o a lunga durata d'azione (per esempio, *ultralenta*) o infusione sottocutanea continua di insulina;
- 6) Regimi di terapia insulinica meno complessi o ipoglicemizzanti orali nei pazienti con DM di tipo 2;
- 7) Educazione continua;

Poiché le complicanze del diabete sono correlate al controllo glicemico, la normoglicemia è l'obiettivo desiderato, ma spesso non raggiunto. La normalizzazione della glicemia per lunghi periodi di tempo è estremamente difficile. L'obiettivo del controllo glicemico deve essere individualizzato e il medico curante dovrebbe

stabilire gli obiettivi della terapia in accordo con il paziente <sup>87</sup>. Alcuni fattori importanti da considerare comprendono l'età del paziente, la sua capacità di comprendere e attuare un regime di trattamento complesso, la presenza e gravità delle complicanze del diabete, la capacità di riconoscere i sintomi di ipoglicemia severa, la presenza di altre patologie o trattamenti che potrebbero alterare la risposta alla terapia e lo stile di vita <sup>85</sup>.

Un controllo glicemico ottimale impone misurazioni della glicemia da parte del paziente e il controllo a lungo termine da parte del medico mediante dosaggio dell'HbA1c e revisione delle automisurazioni glicemiche del paziente <sup>94</sup>. Le misurazioni glicemiche del paziente forniscono un quadro del controllo glicemico a breve termine, mentre l'HbA1c riflette il controllo glicemico medio dei precedenti 2-3 mesi in quanto gli eritrociti hanno una vita media di 120 giorni <sup>87</sup>. L'*automonitoraggio della glicemia (SMBG)* è importante nella gestione del diabete e consente al paziente di controllare la glicemia in ogni momento <sup>87,131</sup>. Nell'SMBG una piccola goccia di sangue e una reazione enzimatica facilmente rilevabile rendono possibile la misurazione della glicemia su sangue capillare; questo sistema consiste nel prelievo di una goccia di sangue a livello capillare, da strisce sulle quali viene posizionato il campione e da un analizzatore per la valutazione quantitativa della glicemia dopo pochi istanti. La frequenza delle misurazioni deve essere individualizzata e stabilita dal medico curante. Gli individui con DM di tipo 1 dovrebbero misurare in modo continuativo le loro glicemie da quattro a otto volte al giorno per modificare le dosi dell'insulina a rapida e lenta durata d'azione. La maggior parte degli individui con DM di tipo 2 richiede SMBG meno frequenti e dovrebbe utilizzare l'SMBG per verificare l'efficacia della terapia e della dieta. Poiché i livelli glicemici fluttuano meno in questi individui, una o due misurazioni al giorno possono essere sufficienti <sup>87</sup>. Per quanto intensificato, però, l'SMBG presenta una serie di limiti dovuti al suo carattere intermittente; questo aspetto ha determinato lo sviluppo di tecniche alternative, portando all'introduzione di sistemi di *monitoraggio continuo del glucosio (CGM)*. Quest'ultimi consentono un migliore controllo glicemico, mediante rilevazione continua con elevata risoluzione temporale (senza l'intervento attivo da parte del paziente) <sup>132,133</sup>. I sensori CGM misurano la glicemia nel fluido interstiziale sottocutaneo (ISF) che circonda le cellule; l'ISF trasporta i nutrienti, incluso il glucosio, e funge da intermezzo tra capillari e cellule. I sensori del glucosio vengono classificati solitamente in base al loro grado di invasività; i sistemi di monitoraggio attualmente utilizzati appartengono alla categoria dei "non invasivi" e soprattutto dei



“minimamente invasivi”. Il sensore di questi dispositivi CGM è associato ad un sistema di trasduzione del segnale che consente di tradurre le variazioni derivanti da reazioni chimiche o movimenti fisici in un segnale elettrico, la cui intensità è proporzionale alla concentrazione di glucosio. I sistemi minimamente invasivi sono dotati di un sensore elettrochimico e i vari modelli si differenziano nella modalità di connessione tra substrato e sensore <sup>134</sup>: sensore ad ago inserito direttamente sottocute oppure esterno nel quale il fluido interstiziale arriva tramite un processo di microdialisi o con un procedimento di ionoforesi. Quest’ultimo processo consiste nell’applicazione, mediante due elettrodi posti a contatto con la superficie cutanea, di una corrente a bassa intensità tramite la quale il glucosio raggiunge il sensore per elettrosmosi. Nei dispositivi sottocutanei il sensore è posizionato sotto l’epidermide e il derma, nello spazio interstiziale tra capillari e cellule; è un biosensore amperometrico minimamente invasivo che sfrutta una reazione enzimatica, l’ossidasi glucidica, per generare elettroni in risposta alle variazioni dei livelli di glucosio <sup>85</sup>. Il primo sistema CGM “minimamente invasivo” approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) fu il dispositivo Continuous Glucose Monitoring System (CGMS®) della Medtronic MiniMed ad ago, che forniva un’analisi retrospettiva per la durata di tre giorni <sup>135</sup>. Nel 2008 la FDA approvò l’utilizzo del dispositivo ad ago Real-Time FreeStyle Navigator® della Abbott Laboratories, in grado di mostrare il livello di glucosio ogni minuto per cinque giorni. Il primo sistema ad utilizzare la tecnologia a microdialisi per la rilevazione della concentrazione di glucosio nell’ISF fu il GlucoDay® della Menarini Diagnostic. Fu approvato dalla FDA nel 2001 e commercializzato anche un dispositivo, chiamato GlucoWatch® G2 Biographer, che sfruttava la ionoforesi inversa per dosare il glucosio nel liquido interstiziale; tale apparecchio, tuttavia, presentava problemi di accuratezza e provocava irritazioni cutanee dovute al passaggio di corrente; è stato quindi ritirato dal mercato nel luglio 2007. È importante comunque sottolineare che anche questi dispositivi devono essere utilizzati, come suggerito dalla FDA, in associazione al tradizionale controllo glicemico mediante refllettometro, che rappresenta pertanto ancora il principale strumento per un’appropriata decisione terapeutica.

Prima del 1975, il monitoraggio abituale dei pazienti comprendeva l’analisi dei chetoni e del glucosio nell’urina. Dalla metà degli anni '80, il test del glucosio urinario è stato sostituito dal test della glicemia capillare, considerato più accurato e affidabile. Tuttavia, i *chetoni urinari* sono ancora oggi un indicatore sensibile di chetoacidosi diabetica iniziale e dovrebbero essere misurati negli individui con DM di

tipo 1 quando la glicemia è > 300 mg/dl, durante una malattia intercorrente o in presenza di sintomi quali nausea, vomito e dolore addominale. I corpi chetonici, generati dall'ossidazione degli acidi grassi, includono acido  $\beta$ -idrossibutirrico, acido acetoacetico e acetone. In soggetti sani, l'acido  $\beta$ -idrossibutirrico e l'acido acetoacetico, presenti in concentrazioni equimolari (0,5–1,0 mmol/l), costituiscono tutti i chetoni sierici; nella chetoacidosi diabetica, invece, il rapporto tra acido  $\beta$ -idrossibutirrico e acido acetoacetico è spesso superiore a 3:1. I livelli dei chetoni nelle urine sono proporzionali ai livelli ematici ma, come per il glucosio urinario, sono influenzati dal volume e dalla concentrazione dell'urina. La chetonuria è determinata utilizzando strisce o compresse reattive, che tuttavia reagiscono solo con l'acetoacetato e con l'acetone, fornendo risultati fuorvianti quando l'acido  $\beta$ -idrossibutirrico è il principale corpo chetonico eliminato.

La *misurazione dell'HbA1c* è il metodo standard per verificare il controllo glicemico a lungo termine. Quando la glicemia è costantemente elevata, si assiste a un incremento della glicosilazione non enzimatica dell'emoglobina. Ci sono numerosi metodi di laboratorio per la misurazione delle varie forme di HbA1c con diversa accuratezza. Grazie alla sua maggiore specificità ed affidabilità, il dosaggio dell'HbA1c eseguito con cromatografia liquida ad alta performance (high-performance liquid chromatography, HPLC) è diventato il metodo standard di riferimento. A seconda del metodo di dosaggio, le emoglobinopatie, l'anemia emolitica e l'insufficienza renale possono interferire con il risultato dell'HbA1c<sup>131</sup>. Quando misurata mediante HPLC, l'HbA1c correla con i seguenti valori medi di glicemia<sup>136</sup>: HbA1c del 6% equivale a 126 mg/dl, 7% a 154 mg/dl, 8% a 183 mg/dl, ecc. Un aumento dell'1% dell'HbA1c comporta quindi un incremento di circa 30 mg/dl della glicemia media. L'emoglobina glicosilata dovrebbe essere misurata in tutti gli individui con DM, durante la valutazione iniziale e come componente del trattamento integrato del diabete<sup>85,87</sup>.

Nei pazienti con DM di tipo 1 la terapia intensiva riduce il rischio di sviluppo o di progressione della retinopatia, della nefropatia e della neuropatia del 50-75%. Ciò corrisponde ad una riduzione dei livelli medi di HbA1c dal 9 al 7,2%. In soggetti sani, il valore percentuale di HbA1c rientra in un range tra 4 e 5,9%. Un paziente diabetico con un buon controllo glicemico ha un livello di HbA1c vicino al range di normalità. Secondo l'American Diabetes Association (ADA), l'HbA1c ottimale dovrebbe essere < 7%<sup>87,137</sup>. I livelli della glicemia all'SMBG ideali sono 80-120 mg/dl (4,2-6,7 mmol/l) prima dei pasti e 100-140 mg/dl (5,6-7,8 mmol/l) al momento di coricarsi<sup>138</sup>. Si deve

tener conto che i valori della glicemia plasmatici sono il 10-15% più alti di quelli dell'SMBG. Il trattamento intensivo è comunque fortemente incoraggiato anche nei pazienti con recente diagnosi di DM di tipo 1, poiché può prolungare il periodo di produzione del peptide C, il che risulta in un migliore controllo glicemico e in una riduzione del rischio di ipoglicemia grave <sup>85</sup>.

Nei pazienti con DM di tipo 2 la terapia intensiva riduce soprattutto il rischio di sviluppare retinopatia e nefropatia; in particolare, per ogni punto percentuale di riduzione dell'HbA1c, si osserva un 35% circa di riduzione del rischio di complicanze microvascolari. Inoltre, la terapia intensiva determina una diminuzione del rischio di infarto miocardio e morte improvvisa del 16%. I livelli ottimali della glicemia da raggiungere sono gli stessi di quelli identificati per il DM di tipo 1, ma il trattamento del DM di tipo 2 deve valutare e trattare tutti i fattori di rischio associati (dislipidemia, ipertensione arteriosa, microalbuminuria).

La *terapia medica nutrizionale (TMN)*, invece, è il termine utilizzato dall'ADA per descrivere il bilancio ottimale tra l'apporto calorico e gli altri aspetti della terapia diabetica <sup>85</sup>. È quindi indispensabile un cambiamento dello stile di vita per una buona aderenza ai programmi nutrizionali e di attività fisica. Dieta ed esercizio fisico, infatti, devono essere considerati interventi fondamentali <sup>87</sup>.

Nel DM di tipo 1, una terapia insulinica rigida impone al paziente un programma alimentare costante e spesso difficile da accettare da parte del paziente stesso; pertanto, è necessario insegnare al paziente la flessibilità e la temporizzazione del dosaggio insulinico sulla base dei risultati dell'SMBG. Una componente importante è quella di minimizzare l'incremento ponderale spesso associato al trattamento diabetico intensivo <sup>85</sup>.

Nel DM di tipo 2 il calo ponderale e il suo mantenimento riducono l'insulinoresistenza <sup>87</sup>. È stato osservato che un bilancio calorico negativo riduce l'insulinoresistenza, dunque l'obiettivo non deve essere tanto il conseguimento del peso corporeo ideale, quanto una perdita di 4,5-9 Kg di peso corporeo sufficiente per migliorare il controllo glicemico, pressorio e lipidico. La maggioranza degli individui con DM di tipo 2 è obesa e il calo ponderale dovrebbe quindi essere fortemente incoraggiato <sup>85</sup>. La quantità media di carboidrati raccomandata per i diabetici è pari al 55-60% delle calorie totali. La dieta dovrebbe inoltre contenere 20-30 g di fibre. I grassi dovrebbero essere limitati al 30% dell'apporto calorico totale e il colesterolo non dovrebbe superare i 300 mg/die. È stato osservato che l'iperlipidemia favorisce ed accelera il danno renale in modelli sperimentali; dunque nei pazienti sovrappeso o affetti da

dislipidemia, l'apporto lipidico dovrebbe essere ridotto a meno del 15% delle calorie totali. L'apporto proteico, invece, dovrebbe rappresentare il 10-20% delle calorie giornaliere; tuttavia, in presenza di microalbuminuria è consigliato ridurre le proteine di origine animale al 10-15%. L'alcol è ossidato a livello epatico e può alterare la gluconeogenesi inducendo ipoglicemia; inoltre l'alcol può indurre un incremento dei trigliceridi e peggiorare l'iperlipidemia.

L'*esercizio fisico* è una componente costitutiva del trattamento terapeutico che può avere molteplici effetti positivi (benefici cardiovascolari, ridotta pressione arteriosa, mantenimento della massa muscolare, riduzione del grasso corporeo, calo ponderale, ecc.)<sup>87</sup>. Per gli individui con DM, l'esercizio fisico è utile anche per ridurre la glicemia e aumentare la sensibilità all'insulina. Dovrebbe essere eseguita principalmente attività aerobica.

Nel DM di tipo 1 l'efficacia dell'esercizio fisico come intervento terapeutico è tuttora discussa. Gli individui con DM di tipo 1 sono soggetti sia ad iperglicemia che a ipoglicemia durante l'esercizio fisico, a seconda della glicemia pre-esercizio, dei livelli circolanti di insulina e del livello di catecolamine indotte dall'esercizio<sup>85</sup>. Infatti, se i livelli di insulina esogena sono elevati, l'attività fisica può anche indurre ipoglicemia, mentre i pazienti diabetici con glicemia > 250 mg/dl prima di iniziare l'esercizio fisico sono a rischio di un ulteriore incremento dei livelli glicemici e di sviluppare chetosi<sup>87</sup>. Nei pazienti con DM di tipo 1 la risposta glicemica all'allenamento dipende dal controllo glicemico, dalle condizioni generali del paziente, dall'integrità del sistema nervoso autonomo, dall'assunzione calorica precedente, dall'intensità e durata dell'attività fisica e dal tempo di picco dell'insulina somministrata. In generale, circa 15 g di carboidrati dovrebbero essere aggiunti prima e dopo lo svolgimento dell'esercizio, mentre è consigliato ridurre le dosi di insulina prima del lavoro fisico<sup>85</sup>. Un allenamento costante, comunque, può determinare una riduzione del 20-30% del fabbisogno giornaliero di insulina.

Nel DM di tipo 2 è stato dimostrato che l'esercizio fisico riduce l'insulinoresistenza periferica, i livelli plasmatici di trigliceridi e delle VLDL. Quindi l'esercizio fisico migliora la glicemia, come risultato del calo ponderale e della diminuzione dell'insulinoresistenza. Poiché il rischio cardiovascolare nei pazienti diabetici di tipo 2 è aumentato, è necessaria una valutazione iniziale mediante ECG da sforzo in ogni paziente diabetico di età superiore ai 40 anni o con possibile patologia cardiovascolare<sup>87</sup>. Inoltre, è importante sottolineare il ruolo fondamentale dell'esercizio fisico in soggetti colpiti da complicanze diabetiche, per i quali è

soprattutto consigliata un'attività aerobica moderata e che non prevede l'utilizzo di pesi<sup>87</sup>.

Tra i programmi terapeutici per un corretto controllo glicemico sono importanti anche adeguati schemi di *somministrazione dell'insulina*, i quali dovrebbero avere l'obiettivo di mimare la fisiologica secrezione insulinica. Gli individui con DM di tipo 1 mancano della produzione insulinica endogena, per cui è essenziale la somministrazione di insulina basale esogena per regolare la glicogenolisi, la gluconeogenesi, la lipolisi e la chetogenesi, mentre la sostituzione insulinica postprandiale dovrebbe essere adeguata all'apporto dei carboidrati e dovrebbe promuovere la normale utilizzazione e il deposito del glucosio. Le attuali preparazioni insuliniche sono prodotte mediante la tecnologia del DNA ricombinante e consistono di sequenze aminoacidiche di insulina umana. L'insulina umana è stata formulata con diverse farmacocinetiche. Attualmente tutta l'insulina è formulata come 100 U (100 unità/ml). Sono disponibili quattro principali tipi di insulina:

- *Insulina ultrarapida (lispro, aspart)*, con un inizio d'azione entro 5-15 minuti e una durata di 3-4 ore;
- *Insulina rapida o regolare*, la cui azione inizia entro 15-30 minuti e dura 5-7 ore;
- *Insuline intermedie*;
- *Insulina ultralenta*.

L'insulina *lispro* è un analogo dell'insulina in cui gli aminoacidi in posizione 28 e 29 della catena B, una lisina e una prolina, sono stati invertiti mediante tecniche di DNA ricombinante. Ha una minor tendenza a formare esameri sottocutanei, per cui quando viene iniettata si dissocia rapidamente in monomeri e viene assorbita raggiungendo il picco sierico in meno di un'ora. Questa modificazione non altera il legame dell'insulina al suo recettore, la sua emivita o la sua immunogenicità. La *lispro* dovrebbe essere somministrata 20 minuti prima dei pasti e la sua durata d'azione è di circa 4 ore. L'insulina *regolare*, invece, è l'unica formulazione disponibile per la somministrazione endovena o con pompe di infusione sottocutanea continua e viene somministrata da 30 a 45 minuti prima di un pasto<sup>85</sup>. Le insuline intermedie comprendono l'insulina *lenta*, che è costituita dal 30% di insulina regolare e dal 70% di insulina ultralenta, e l'insulina *NPH*, che è coniugata con protamina. Entrambe iniziano ad agire dopo 2-4 ore dalla somministrazione e l'azione si protrae per meno di 24 ore. La miscibilità dell'insulina regolare con la *NPH* consente la produzione di *combinazioni di insulina* che contengono il 75% di *NPH* e il 25% di regolare (75/25), il 70% di *NPH* e il 30% di regolare (70/30) o miscele equivalenti di

NPH e di regolare (50/50). Infine, l'insulina *ultralenta* ha un inizio d'azione ritardato, raggiunge il picco d'azione dopo 8-14 ore e dura fino a 36 ore. Recentemente è stata anche introdotta l'insulina *glargine*, la quale deriva da due modificazioni dell'insulina umana; dopo iniezione sottocute, l'insulina glargine forma un microprecipitato e viene assorbita in modo ritardato e relativamente costante nel tempo, mimando la secrezione continua di insulina nei soggetti sani. L'insulina glargine non può essere miscelata con altre formulazioni insuliniche. L'inizio della sua azione è più ritardato rispetto all'NPH e la durata d'azione è molto più lunga (21 contro 14 ore). È comunque importante sottolineare una considerevole variabilità da paziente a paziente nel picco e nella durata di queste preparazioni insuliniche; generalmente, in tutti i regimi, le insuline a lunga durata d'azione forniscono l'insulina basale, mentre l'insulina prandiale è fornita dall'insulina regolare o dalla lispro. Tuttavia, nessun programma insulinico riproduce esattamente il preciso profilo secretorio dell'insulina delle isole pancreatiche; per ottenere un quadro più fisiologico possibile sono previste iniezioni insuliniche molto frequenti, un maggiore utilizzo di insulina rapida e misurazioni della glicemia capillare costanti e ripetute <sup>85</sup>.

Nei soggetti diabetici di tipo 1, circa il 40-50% dell'insulina dovrebbe essere data come insulina basale; uno schema solitamente utilizzato prevede due iniezioni quotidiane di insulina intermedia combinate con insulina rapida prima dei pasti del mattino e della sera. La dose insulinica in questi regimi dovrebbe essere adeguata sulla base dei risultati dell'SMBG tenendo conto di alcuni principi generali:

- 1) la glicemia a digiuno è principalmente determinata dall'insulina intermedia della sera precedente;
- 2) la glicemia preprandiale è funzione dell'insulina rapida del mattino;
- 3) la glicemia prima della cena è funzione dell'insulina intermedia del mattino;
- 4) la glicemia al momento di coricarsi è funzione dell'insulina rapida prima di cena.

Gli schemi insulinici a componenti multiple si riferiscono alla combinazione dell'insulina basale, dell'insulina rapida preprandiale e delle variazioni delle dosi di insulina rapida per adeguarsi ai risultati dei frequenti SMBG, degli anticipi nei consumi alimentari e dell'attività fisica; questo sistema, chiamato anche *sistema delle iniezioni multiple giornaliere*, offre al paziente la massima flessibilità in termini di stile di vita e la migliore possibilità di raggiungere una glicemia quasi normale <sup>85</sup>. Ci sono numerose variazioni di questi schemi che possono essere ottimizzati per i singoli pazienti. Anche l'infusione sottocutanea continua di insulina (ISCI) è un regime insulinico a componenti multiple; attualmente sono disponibili dispositivi di infusione

insulinica sofisticati che sono in grado di rilasciare in modo preciso piccole dosi di insulina ( $\mu\text{l}$  per ora). Questi dispositivi, tuttavia, possono a volte provocare un'infezione nel sito di infusione, un'iperglicemia inspiegata dovuta all'ostruzione del dispositivo di iniezione o una chetoacidosi diabetica se la pompa si disconnette.

Nel DM di tipo 2 di recente diagnosi, dosi modeste di insulina sono abbastanza efficaci nel controllare l'iperglicemia. L'insulina dovrebbe essere considerata come terapia iniziale in questo tipo di diabete, particolarmente nei soggetti magri o in quelli con importante calo ponderale, nei soggetti affetti da malattie acute, nonché negli individui con nefropatia diabetica o epatopatia sottostante che preclude l'uso di ipoglicemizzanti orali. La terapia insulinica è, infine, necessaria in un numero significativo di individui con DM di tipo 2 a causa della natura progressiva della malattia e la relativa carenza insulinica che si sviluppa nei pazienti con diabete di lunga durata. Dal momento che la secrezione endogena di insulina continua ed è in grado di fornire una certa copertura all'apporto calorico con i pasti, la somministrazione di insulina viene solitamente iniziata come singola dose di insulina intermedia, prima di colazione o appena prima di coricarsi.

I *farmaci ipoglicemizzanti* devono essere utilizzati solo nei pazienti con DM di tipo 2; infatti, a eccezione degli inibitori dell' $\alpha$ -glucosidasi, essi sono inefficaci nel DM di tipo 1. In base al loro meccanismo d'azione, gli ipoglicemizzanti orali sono suddivisi in farmaci che aumentano la secrezione insulinica, farmaci che riducono la produzione di glucosio o farmaci che aumentano la sensibilità insulinica <sup>85</sup>. Questi farmaci (sulfoniluree e metformina) possono accumularsi e sono controindicati nell'insufficienza renale o epatica, poiché la maggior parte di essi è metabolizzata a livello epatico in composti che sono poi eliminati dal rene.

Controllo pressorio: L'ipertensione generalmente sviluppa entro 2-5 anni dalla comparsa di microalbuminuria. Tuttavia, uno studio ha dimostrato che anche prima di questa fase, la pressione sanguigna aumenta progressivamente entro il range di normalità e che un cambiamento del ritmo circadiano tende a precedere l'insorgenza di microalbuminuria <sup>126</sup>. Lo stretto controllo pressorio riduce l'escrezione di albumina e rallenta il declino della funzione renale <sup>129</sup>. Nel suo ultimo report pubblicato sulla prevenzione, valutazione e trattamento dell'elevata pressione arteriosa nei soggetti diabetici, la Joint National Committee <sup>139</sup> ha raccomandato un valore pressorio ottimale  $\leq 130/80$  mmHg per i pazienti ipertesi con DM; quest'ultimo obiettivo è stato confermato anche da altre società, che inoltre hanno aggiunto  $125/75$  mmHg come valore ideale per i soggetti con proteinuria superiore a  $1$  g/24 h.

Terapia antiipertensiva: Per la normalizzazione della pressione arteriosa sistemica e un'adeguata protezione a livello renale sono stati dimostrati effetti benefici con l'utilizzo di alcuni farmaci antiipertensivi. Nella nefropatia diabetica associata ad ipertensione arteriosa è consigliata la somministrazione di più farmaci: calcio-antagonisti, bloccanti, e diuretici in associazione ad antagonisti dell'angiotensina II e ACE-inibitori.

Gli *ACE-inibitori* riducono la progressione della nefropatia conclamata negli individui con DM di tipo 1 o di tipo 2 <sup>94,140</sup>. Dopo 2-3 mesi di terapia, il dosaggio della proteinuria dovrebbe essere ripetuto e la dose del farmaco aumentata fino a quando la microalbuminuria scompare. Gli ACE-inibitori esplicano il loro effetto sull'ipertensione arteriosa sistemica, modificano positivamente l'emodinamica glomerulare e riducono la proteinuria. In uno studio su pazienti diabetici di tipo 1 normotesi con microalbuminuria, sottoposti ad un trattamento con ACE-inibitori di durata superiore ai 2 anni, è stata riscontrata una riduzione del 60% nella progressione a macroalbuminuria e un aumento triplo della regressione a normoalbuminuria <sup>140</sup>. Inoltre, numerosi studi hanno mostrato l'efficacia di tali farmaci nel ridurre la proteinuria del 40-50% sia in pazienti con DM di tipo 1 che di tipo 2; è stato evidenziato anche un significativo ritardo nel deterioramento della funzionalità renale. Dunque è chiaramente documentato un effetto benefico degli ACE-inibitori in soggetti diabetici con microalbuminuria normotesi o ipertesi, rallentando l'evoluzione della nefropatia diabetica verso l'insufficienza renale.

Gli *antagonisti dei recettori dell'angiotensina II (ARBs)* possono costituire un'alternativa terapeutica e la loro efficacia è stata dimostrata essere simile a quella degli ACE-inibitori <sup>141-144</sup>. Soprattutto nei pazienti diabetici con proteinuria, la combinazione di più farmaci antiipertensivi è consigliata per migliorare ulteriormente il controllo della pressione arteriosa sistemica; in diversi studi, particolare interesse è stato rivolto alla somministrazione simultanea di ACE-inibitori e ARBs, allo scopo di ridurre maggiormente la proteinuria in pazienti diabetici microalbuminurici con ipertensione <sup>145</sup>. Qualora gli obiettivi terapeutici non siano raggiunti con i convenzionali dosaggi di ACE-inibitori o ARBs, una possibile strategia consiste nell'utilizzo combinato di dosi più elevate di questi farmaci, in modo tale da ottenere un'aggiuntiva riduzione della secrezione urinaria di albumina <sup>146,147</sup>. Dunque data l'importanza del ruolo della proteinuria nella progressione della nefropatia diabetica <sup>148</sup>, l'escrezione proteica dovrebbe essere diminuita ad un valore inferiore a 1 g/24 h (livello ottimale 0,3 g/24 h).



È importante comunque sottolineare che, l'associazione di *calcio-antagonisti*, *bloccanti*, e *diuretici* agli ACE-inibitori favorisce il blocco del sistema renina-angiotensina (RAS), la cui efficacia può essere aumentata ulteriormente mediante inibizione del recettore dei mineralcorticoidi. Elevate concentrazioni di aldosterone nel plasma e nelle urine sono state mostrate essere correlate con la progressiva riduzione della velocità di filtrazione glomerulare nonostante il blocco di RAS e dell'angiotensina II <sup>149,150</sup>; dunque la somministrazione aggiuntiva di spironolattone agli ACE-inibitori o ARBs diminuisce la proteinuria nei pazienti diabetici <sup>151</sup>. Tuttavia quest'ultimo approccio terapeutico risulta azzardato nel caso in cui i livelli di creatinina sierica sono elevati, in quanto può aumentare il rischio di un eccesso di potassio nel sangue.

#### **1.3.1.8 Trapianto e altre terapie emergenti**

Il *trapianto di pancreas* è efficace nel migliorare significativamente la qualità di vita dei pazienti diabetici, soprattutto eliminando il bisogno di insulina esogena, delle frequenti misurazioni glicemiche e delle restrizioni alimentari. Il trapianto inoltre è in grado di eliminare le complicanze acute dell'iperglicemia e dell'ipoglicemia, ma ha solo un effetto parziale sulle complicanze renali e neurologiche a lungo termine. In ogni caso, il trapianto di pancreas è un'alternativa valida solo in pazienti diabetici selezionati:

- 1) pazienti con malattia renale allo stadio terminale;
- 2) pazienti con una storia di complicanze metaboliche acute gravi, con impossibilità nel prevenire le complicanze acute e con difficoltà serie nella gestione della terapia insulinica.

In studi precedenti, è stato mostrata un'evidente regressione della glomerulosclerosi in pazienti diabetici con nefropatia a seguito di trapianto pancreatico <sup>152</sup>. La sopravvivenza dopo l'insorgenza dello stadio terminale della malattia renale è più breve nella popolazione diabetica rispetto a quella non diabetica. Il trattamento sostitutivo di scelta per i pazienti diabetici allo stadio terminale della malattia renale (ESRD) è rappresentato da *dialisi peritoneale*, *emodialisi*, *trapianto renale o combinato rene-pancreas*. L'aterosclerosi è la causa principale di morte negli individui diabetici in dialisi e l'iperlipidemia dovrebbe essere trattata aggressivamente. Il tasso di sopravvivenza a 5 anni dopo trapianto è circa il 70%, che risulta più favorevole rispetto ad una percentuale <35% per i pazienti diabetici sottoposti a dialisi. Il trapianto renale da un donatore vivente si è rilevato negli ultimi anni la terapia di scelta nei pazienti diabetici con insufficienza renale terminale, ma

richiede una terapia immunosoppressiva cronica per prevenire il rigetto e la recidiva del processo autoimmune. La presenza di altre complicanze quali la retinopatia o la neuropatia, anche in fase avanzata, non è una controindicazione al trapianto di rene o al trapianto combinato di rene e pancreas.

Inoltre, progressi nella biologia molecolare e nuove scoperte nell'ambito dei meccanismi fisiologici dell'omeostasi glucidica hanno portato a numerose terapie emergenti per il diabete e le sue complicanze. Per esempio, l'aminoguanidina, un inibitore della formazione di prodotti terminali di glicosilazione avanzata, e gli inibitori della proteinchinasi C possono ridurre le complicanze del DM.

## 1.4 LA PROTEOMICA

La proteomica è l'analisi su larga scala del complesso di proteine codificate ed espresse dall'intero genoma di un organismo (*proteoma*) in determinate condizioni ambientali. Il proteoma, infatti, rappresenta l'insieme di tutti i possibili prodotti proteici espressi in una cellula, incluse tutte le isoforme e le modificazioni post-traduzionali a cui queste proteine vanno incontro in determinate condizioni fisiopatologiche, non tanto singolarmente, quanto piuttosto come complesso proteico. Il proteoma è dinamico nel tempo, varia in risposta a fattori esterni e differisce sostanzialmente tra i diversi tipi cellulari di uno stesso organismo.

La proteomica, dunque, analizza e caratterizza la struttura, la funzione e l'espressione di tutte le proteine nell'ambito di una cellula, un tessuto, un liquido biologico o un organismo in un dato momento.

Inoltre, il termine proteomica identifica anche l'insieme delle tecnologie e degli approcci sviluppati per lo studio del proteoma <sup>153</sup>.

Questo termine è stato coniato, nel 1996, in analogia al termine *genomica*, disciplina rispetto alla quale la proteomica costituisce il passo successivo, essendo una disciplina più complessa. Infatti, il proteoma differisce da cellula a cellula ed è in continua evoluzione a seguito delle sue molteplici interazioni con il genoma e l'ambiente <sup>154</sup>. Dunque, la proteomica mira a colmare il *gap* tra la sequenza genomica e la fisiologia della cellula e a studiare la dinamica dei prodotti genici e delle loro interazioni <sup>155</sup>.

Sebbene le definizioni di proteoma e proteomica siano abbastanza recenti, questi sono ormai accettati e menzionati in numerose pubblicazioni scientifiche. Le prime ricerche sono state pubblicate nel 1995 e, da quel momento, il loro numero è

creciuto continuamente con estrema rapidità. Per questo, più dell'80% dei lavori di questo settore sono stati pubblicati negli ultimi anni.

Il DNA cellulare, sottoposto a determinati stimoli, esprime una serie di geni correlati tra loro, la cui espressione finale è costituita dalle proteine. Queste proteine, a volte, non vengono subito espresse dall'mRNA, ma si esprimono in modi e in tempi diversi. Non c'è, dunque, una stretta linearità tra gene e proteina corrispondente, o proteoma di una cellula. La proteomica è, quindi, complementare alla genomica, in quanto si focalizza sul prodotto del gene.

La proteomica ha aperto prospettive di notevole interesse in molti e differenti campi della medicina, della biologia, della biochimica, della tossicologia e della farmacologia. Essa, dunque, consente di identificare le proteine associandole ad uno stato fisiologico e a monitorarne l'alterazione di espressione in condizioni differenti<sup>156</sup>. Le proteine "segnale" identificate possono essere utilizzate come nuovi *biomarkers* o per lo studio della funzione dei corrispettivi geni; inoltre possono essere utilizzate per osservare gli effetti di specifici trattamenti o stimoli ambientali<sup>157</sup>. Infatti, se ad ogni proteina potrà essere associato un nome, determinate caratteristiche strutturali, biochimiche, ed una funzione, ma soprattutto una localizzazione all'interno di una cascata di eventi cellulari, la proteomica consentirà di analizzare situazioni sia fisiologiche che patologiche, effetti tossici indotti da farmaci, interazioni tra differenti tipi di stimoli, in materiali biologici complessi quali il liquor, il siero, il plasma, l'urina e tutti i materiali patologici di origine infiammatoria o neoplastica<sup>158,159</sup>.

Un uso più sofisticato della proteomica permette di studiare le proteine che in un determinato sistema possono essere modificate, sempre in termini quantitativi e qualitativi, da fattori endogeni quali modulazione della trascrizione, modificazioni post-traduzionali, splicing alternativi e interazioni con altre proteine o con acidi nucleici<sup>160</sup>. Tutti questi fattori modificano le caratteristiche delle proteine (per esempio l'emivita), che non sono direttamente prevedibili in base alla struttura dell'acido nucleico o dell'mRNA ad esso correlato (infatti il numero di geni umani è compreso fra 20000 e 25000<sup>161</sup>, rispetto a circa 250000-500000 proteine derivate dai geni nel proteoma umano). Ne consegue che da uno stesso gene possono essere formate numerose proteine che solo un approccio sistematico basato sulla proteomica permette di studiare.

Sicuramente anche in futuro, la combinazione di proteomica e genomica continuerà a rivestire un ruolo fondamentale nella ricerca biomedica e avrà un impatto significativo sullo sviluppo di sistemi diagnostici<sup>155</sup>. Infatti, la conoscenza di

modificazioni a carico degli acidi nucleici consentirà, con la proteomica, di stabilire la cascata di eventi indotta dalla malattia; inoltre, la correlazione dei dati proteomici con quelli genomici permetterà di stabilire l'effettivo ruolo sia delle proteine che dei geni in situazioni patologiche, e quindi scoprire nuovi bersagli proteici di interesse diagnostico e terapeutico. Una delle nuove aree di ricerca nel campo diagnostico e terapeutico delle patologie multifattoriali è rappresentata proprio dalla proteomica <sup>162</sup>. È importante comunque sottolineare che, se per gli acidi nucleici esiste una tecnica (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) che consente di amplificare una determinata sequenza genica, per le proteine non si dispone ancora di alcun metodo di espansione selettiva. È necessario, quindi, che le tecniche di analisi della proteomica presentino una sensibilità elevata, in modo da permettere la rilevazione di proteine o peptidi poco rappresentati e sconosciuti, ma utili dal punto di vista della fisiopatologia del distretto in esame, senza che siano “nascosti” da altre proteine abbondantemente espresse <sup>163</sup>.

Il campo della proteomica si è sviluppato fortemente in quest'ultimi anni, anche grazie alla tecnologia ed alla ricerca applicata nello studio di tecniche o strumentazioni, che hanno permesso di rilevare quantità di proteine dell'ordine di picogrammi così come riuscire a separare le proteine stesse nell'ordine di microgrammi/nanogrammi.

Dunque, il termine proteomica non fa riferimento ad una specifica metodica di rilevazione, ma si avvale di più tecniche, correlate tra loro, per comprendere l'espressione e la funzione delle proteine nella regolazione dei sistemi biologici.

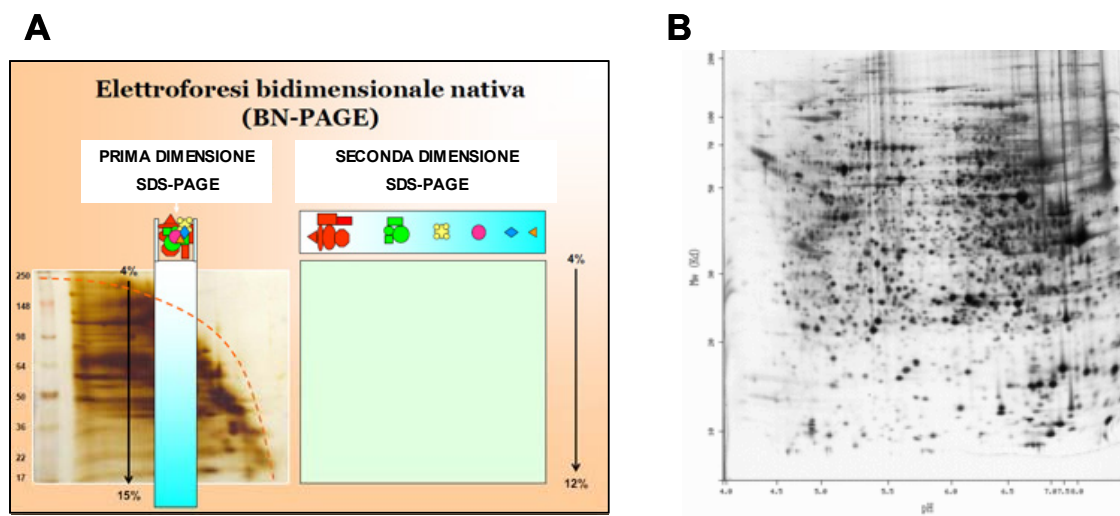
Inizialmente, la proteomica si è focalizzata sulla creazione di mappe proteiche di estratti cellulari mediante l'utilizzo della tecnica di *elettroforesi bidimensionale (2DE-PAGE)*, che separa le proteine prima per punto isoelettrico e poi in base al peso molecolare, consentendo un'elevata risoluzione e riproducibilità <sup>164,86</sup> (Figura 10).

Grazie a questa metodica è possibile confrontare, con potenti tecniche di analisi d'immagine, il proteoma dello stesso tessuto o organismo in differenti stati fisiologici e in seguito a trattamenti; inoltre, è anche possibile studiare una particolare proteina cellulare che si considera un potenziale marcatore patologico <sup>165</sup>.

Successivamente, allo studio del solo profilo di espressione proteica, si è aggiunta l'analisi delle modificazioni post-traduzionali e delle interazioni tra le proteine <sup>166</sup>.

L'elettroforesi bidimensionale continua ad essere una tecnica di eccellenza per lo studio del profilo di espressione proteica e per l'analisi quantitativa, anche se risulta

limitata nel campo clinico, a causa della laboriosità delle procedure e del dispendio di tempo che il protocollo richiede <sup>167,153,155</sup>.



**Figura 10. A.** Principi di elettroforesi bidimensionale nativa. **B.** 2D-Gel di proteine umane. In ordinata la separazione in base al peso molecolare (kDa), in ascissa in base al valore di punto isoelettrico (Immagine tratta da [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

Le recenti innovazioni tecnologiche nel campo della proteomica hanno tuttavia permesso di aumentare la sensibilità e specificità del metodo grazie allo sviluppo della *spettrometria di massa (MS)* <sup>157,168</sup>. Infatti, le proteine individuate dalla comparazione delle mappe proteiche, risultate essere sovra o sotto espresse in differenti stati fisiologici o in seguito a trattamento, vengono estratte dal gel, al fine di eseguire un'identificazione e una caratterizzazione utilizzando la tecnica chiamata *peptide-mass fingerprinting (PMF)* e la spettrometria di massa <sup>158,160</sup>. L'identificazione avviene grazie a strumenti bioinformatici, che permettono il confronto delle masse sperimentali dei peptidi derivati da proteolisi (la digestione avviene nella maggior parte dei casi con tripsina) con quelle teoriche attese dalla sequenza amminoacidica delle proteine presenti nel database e derivanti da una digestione virtuale con uno specifico enzima. Il principio del PMF si basa essenzialmente sull'accuratezza della misurazione della massa e sulla specificità di taglio dell'enzima. Il vantaggio del metodo sta nel fatto che si può identificare una proteina senza determinarne la sequenza amminoacidica, ma semplicemente conoscendo le masse dei peptidi ottenuti per proteolisi.

Sfortunatamente non tutte le proteine possono essere identificate con il peptide mass fingerprinting. Una grossa percentuale di proteine non è tuttora inserita nei database con la completa sequenza amminoacidica, le proteine piccole spesso non forniscono un numero sufficiente di peptidi triptici per un'identificazione univoca e le miscele

proteiche non sono sempre facilmente interpretabili con questa tecnica. Nella maggior parte di questi casi, viene condotto un ulteriore passaggio analitico con la spettrometria di massa electrospray (ESI-MS); La soluzione contenente i peptidi derivanti dalla digestione enzimatica “in-gel” viene introdotta nello spettrometro mediante ESI o nanoESI dinamica, oppure senza una preliminare separazione cromatografica (ESI o nanoESI statica). Dopo aver ottenuto lo spettro di massa, si può automaticamente selezionare uno o più ioni e promuovere la loro frammentazione mediante *collision induced decomposition* (CID) con gas quali azoto o argon. Vengono così prodotte numerose serie di ioni (MS/MS), dalle quali si possono ottenere informazioni complete o parziali sulla sequenza amminoacidica. Attualmente la proteomica si sviluppa su diversi livelli, come è ben visibile nella Tabella 9 riportata di seguito:

<b>TIPOLOGIA</b>	<b>OBIETTIVI</b>
<b>Proteomica sistematica</b>	Identificazione e caratterizzazione del proteoma, oltre che costruzione di database, al fine di creare mappature di riferimento delle proteine espresse in vari tessuti e fluidi biologici.
<b>Proteomica differenziale o di espressione</b>	Studio dell'espressione differenziale delle proteine in cellule diverse di uno stesso organismo ed in momenti di vita differenti di una stessa cellula. Confronto dei profili di espressione proteica in varie situazioni biologiche (ad es., condizione fisiologica e patologica), e dell'evoluzione del proteoma a seguito di trattamenti farmacologici.
<b>Proteomica funzionale</b>	Studio delle interazioni tra proteine, delle interazioni tra una proteina e i suoi substrati (metabolomica) e delle funzioni specifiche delle proteine stesse ( <i>enzyme genomics, biochemical genomics</i> ).
<b>Proteomica strutturale</b>	Determinazione o predizione della struttura 3D di una proteina.

**Tabella 9.** Diverse tipologie di proteomica.

In particolare, però, negli ultimi anni è aumentato l'interesse per l'applicazione della proteomica alla diagnostica clinica e alla medicina preventiva; la **proteomica clinica** mira all'identificazione di marcatori biologici in grado di caratterizzare e predire una patologia e alla creazione di profili proteici che permettano una diagnosi precoce e un chiarimento dei meccanismi di insorgenza della malattia <sup>169</sup>.

### 1.4.1 LA PROTEOMICA CLINICA

Negli ultimi anni la proteomica ha assunto sempre più importanza nel campo della ricerca clinica, mirando all'identificazione di marcatori biologici utili al fine di caratterizzare e predire una patologia multifattoriale. Molte tecnologie possono essere impiegate per caratterizzare il proteoma; in particolare, le tecniche di profiling basate sull'utilizzo della spettrometria di massa (MS) consentono di rilevare proteine/peptidi differenzialmente espressi in tessuti e fluidi biologici durante i processi fisiologici e patologici <sup>170</sup>.

Dunque, il principale obiettivo delle indagini proteomiche cliniche è appunto quello di identificare proteine che presentano differenze qualitative/quantitative tra diverse condizioni fisiologiche. Il costante aumento di letteratura in questo campo mostra il crescente interesse nella proteomica differenziale.

Esistono due strategie per la ricerca di biomarcatori proteici nell'organismo. La prima prevede di effettuare la ricerca direttamente nei tessuti dove la concentrazione di tali markers è più elevata, rendendo più facile l'analisi in spettrometria di massa. Attualmente vengono continuamente sviluppati nuovi approcci per ottenere un profilo quantitativo delle proteine usando la spettrometria di massa; uno di questi metodi è basato su tecniche di marcatura con differenti tipologie di isotopi stabili e spettrometria di massa <sup>171</sup>. Un reagente contenente isotopi stabili (*isotope coded affinity tag*, ICAT) viene utilizzato per modificare le proteine ottenute da una condizione fisiologica ed una patologica. Le due popolazioni di proteine, modificate ciascuna con un differente isotopo, vengono miscelate, estratte con una colonna di affinità e analizzate mediante LC-ESI-MS/MS. Successivamente le proteine sono identificate e viene valutata la loro differenza di espressione sulla base della diversa intensità degli ioni prodotti. L'altro valido approccio è costituito, invece, dalla ricerca dei marcatori direttamente in fluidi periferici; questa tipologia di campioni infatti può essere facilmente ottenuta mediante procedure non invasive ed inoltre consente di studiare le numerose proteine secrete dai tessuti patologici.

Purtroppo la diagnosi basata su marcatori singoli è ormai ampiamente riconosciuta come non risolutiva poiché la maggior parte delle malattie deriva da alterazioni poligeniche <sup>172,173</sup>. Nessuno dei marcatori fino ad oggi individuati nel siero, come il CA-125 per il carcinoma ovario, può essere utilizzato da solo per uno screening. I risultati ottenuti in studi retrospettivi hanno dimostrato come la diagnosi di cancro possa essere resa molto più accurata combinando modelli predittivi multivariati con i marker tumorali preesistenti <sup>174</sup>. Questi dati hanno indubbiamente aumentato

l'interesse nei confronti della ricerca di biomarcatori multipli da usare a scopo diagnostico.

È comunque importante sottolineare che i campioni biologici utilizzati sono costituiti da una matrice con un'elevata complessità, quindi è essenziale eseguire un prefrazionamento (frazioni subcellulari, cromatografia <sup>162</sup>, estrazione sequenziale, ecc.) al fine di eseguire un'analisi proteomica robusta e di alta qualità mediante spettrometria di massa. Infatti la preparazione del campione può significativamente influenzare la sensibilità dell'analisi spettrometrica <sup>175</sup>. Negli ultimi anni sono state sviluppate diverse alternative per la ricerca di biomarcatori in grado di ovviare ad alcune limitazioni della 2DE. Si stima che la concentrazione dei markers tumorali nei fluidi periferici (siero, plasma e urine) sia piuttosto bassa, nell'ordine delle picomoli al litro (pmol/l); mentre la sensibilità dell'analisi, per spettrometri di massa di tipo MALDI-TOF, è nell'ordine delle fmoli. Appare quindi evidente la possibilità di poter rilevare tracce anche molto ridotte di sostanze in matrici biologiche complesse e di identificare marcatori biologici.

Un approccio innovativo consiste nell'accoppiamento della spettrometria di massa MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*) con un sistema cromatografico su fase solida del campione, basato sull'utilizzo di superfici funzionalizzate che permettono l'arricchimento specifico di proteine e peptidi <sup>176</sup>. Diversi tipi di barrette, chiamate ProteinChips, con superfici a scambio cationico o anionico, idrofobiche o idrofiliche, con affinità metallica o caricate con anticorpi, sono utilizzate per isolare selettivamente proteine e peptidi in base alle diverse tipologie di interazioni <sup>177</sup>. Si tratta di matrici su cui sono presenti ligandi di tipo chimico (cationi, anioni, ecc.) o biologico (anticorpi, DNA, enzimi, recettori, ecc.), che legano in modo specifico le proteine e i peptidi <sup>162,153</sup>. Successivamente, le ProteinChips vengono direttamente introdotte nello spettrometro di massa per l'analisi. Questa procedura, nota con il nome di SELDI-TOF-MS (*surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*) (Figura 10), è un metodo di analisi che può essere applicato a un numero elevato di campioni permettendo di conferire all'indagine una forte valenza statistica <sup>178</sup>. Con la tecnologia SELDI possono essere analizzate quantità molto piccole di campione (0.5-400 µl) e si ottengono risultati rapidamente <sup>179</sup>. La tipologia di campioni che può essere analizzata con la tecnologia SELDI è piuttosto varia; principalmente è stata ideata per l'applicazione a fluidi biologici come siero, plasma e urine, che sono quelli attualmente più studiati, ma vi sono anche studi su fluido cerebrospinale, liquido amniotico, sudore, lacrime e fluidi di



aspirazione (es. da dotti mammari) <sup>163,180</sup>. Negli ultimi anni, inoltre, alcuni gruppi di ricerca hanno cercato di applicare la tecnica anche nell'analisi diretta di sezioni di tessuto <sup>153,155</sup>.



**Figura 10.** ProteinChips utilizzate nella metodica SELDI (Immagine tratta da [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)).

Come dimostra il numero di pubblicazioni presenti ad oggi, molti ricercatori si sono orientati sull'approccio SELDI. Negli ultimi sei anni si contano più di 700 pubblicazioni relative a questa tecnologia, soprattutto in campo oncologico ed orientate principalmente ai tumori delle ovaie e della prostata <sup>163</sup>. Il tumore all'ovaio presenta il maggior tasso di mortalità fra tutti i tumori ginecologici e l'unico biomarker attualmente riconosciuto è il *CA-125*, che risulta sovraespresso soltanto nel 50% dei tumori allo stadio precoce e nell'80% allo stadio avanzato. In questi ultimi anni, tuttavia, diversi studi hanno portato all'individuazione di patterns di biomarcatori che, benché siano differenzialmente espressi anche in altre patologie, se usati in combinazione possono essere associati in modo statisticamente significativo a soggetti affetti da tumore alle ovaie con valori di sensibilità e specificità diagnostica rispettivamente del 100% e 95% <sup>181,182</sup>. In uno studio del 2004 pubblicato sulla rivista *Cancer Research*, l'analisi di campioni di siero e l'utilizzo nella fase di validazione anche di differenti patologie ha permesso di trovare un pattern di biomarkers in grado di discriminare tra la patologia al primo stadio, altri tipi di tumori benigni e altre malattie ginecologiche. Questo lavoro si è concluso con la caratterizzazione di tre marcatori (*apolipoproteina A-I* e una *forma tronca della transtiretina* risultano sottoesprese nei pazienti, mentre un *frammento dell'inibitore dell'inter- $\alpha$ -tripsina* è invece sovraespresso) <sup>183</sup>. Negli ultimi due anni, sono seguiti ulteriori lavori applicati anche ad altri tipi di fluidi biologici come plasma e urine <sup>184,166</sup>.

Per quanto riguarda, invece, il tumore alla prostata, è stato identificato e riconosciuto come biomarcatore il *PSA*, che tuttavia genera un elevato numero di falsi positivi

(specificità del 71%) e non è in grado di distinguere fra forme aggressive di tumore e forme clinicamente meno rilevanti <sup>163</sup>. Anche in questo caso, diversi lavori hanno descritto patterns di biomarcatori con specificità tra l'85% e il 100%, comunque superiore a quella del singolo PSA <sup>185</sup>. In uno studio pubblicato sulla rivista *Clinical Cancer Research* nel 2005, è stato identificato un pattern di biomarcatori ottimale per la diagnosi del tumore alla prostata e, grazie all'utilizzo combinato di diverse tecnologie (SELDI con IMAC-Cu, cromatografia a fase inversa, SDS-PAGE, LC-MS/MS, Western Blotting, ecc.), è stato possibile caratterizzare uno di questi marcatori come un'isoforma della apolipoproteina A-II; questa proteina risulta non solo specifica per i tumori alla prostata, ma anche sovraespressa in soggetti con un basso livello di PSA (< 4 ng/ml) <sup>186</sup>.

Numerosi studi di validazione sulla tecnologia SELDI sono stati condotti per comprovarne la riproducibilità e la sua effettiva applicabilità a studi clinici <sup>9,71</sup>. Infatti, molti fattori possono influenzare la riproducibilità del sistema specialmente nella fase di raccolta dei campioni <sup>163</sup>; dunque, la fase preanalitica riveste un ruolo cruciale nello step analitico e può influenzare enormemente il risultato finale andando anche ad annullare le differenze biologiche <sup>157,187</sup>. Uno studio multicentrico del 2005 pubblicato sulla rivista *Clinical Chemistry*, che coinvolge sei centri di ricerca, ha dimostrato che se la raccolta dei campioni e l'analisi dei dati vengono condotte correttamente la tecnica si dimostra riproducibile <sup>188</sup>. In ogni caso, è necessario stabilire protocolli standardizzati per contenere la variabilità legata alla fase preanalitica <sup>189,190</sup>.

Diversi lavori hanno inoltre valutato la capacità della tecnica SELDI di rilevare proteine presenti a basse concentrazioni nei fluidi biologici ed è risultato che questa problematica non è associata alla tecnologia in sé, che di fatto ha una elevata sensibilità <sup>191</sup>, quanto invece alla fase di preparazione del campione. Campioni di siero e plasma hanno infatti una notevole ricchezza proteica e le proteine che li costituiscono presentano un range di concentrazione molto ampio <sup>181</sup>. Le proteine meno abbondanti risultano quindi coperte e difficilmente visualizzabili nell'insieme <sup>192</sup>. Per ovviare a questo problema si possono eliminare le proteine più abbondanti mediante cattura con anticorpi oppure si possono eseguire sistemi di prefrazionamento del campione prima dell'analisi con le ProteinChips <sup>155</sup>.

Lo studio delle interazioni tra le proteine, invece, è stato rivoluzionato mediante lo sviluppo dei *protein microarrays*. Generalmente, vengono utilizzati anticorpi o sonde specifiche per la rilevazione delle proteine, e l'interazione e l'intensità del legame tra

di esse sono calcolate valutando la fluorescenza emessa o mediante spettrometria di massa. Questo approccio può sicuramente aiutare a comprendere, ancor più nello specifico, i meccanismi alla base dello sviluppo di determinate patologie.

Ulteriori ausili allo sviluppo degli studi proteomici sono derivati anche dalla creazione di banche dati di riferimento che contengono tutte le possibili sequenze geniche espresse e dallo sviluppo di strumenti bioinformatici e algoritmi in grado di eseguire ricerche, confronti ed elaborazioni complesse di profili proteici in tempi rapidi <sup>179,157</sup>.

#### **1.4.1.1 La tecnologia CLINPROT**

Come precedentemente riportato, un approccio innovativo in proteomica clinica è rappresentato da tecniche di estrazione in fase solida (*solid phase extraction*) basate sul prefrazionamento del proteoma con sistemi a superficie funzionalizzata. Tali metodiche consentono la ricerca diretta di marcatori nei fluidi biologici, processando un elevato numero di campioni in un giorno in condizioni automatizzate e con diverse affinità di legame. Il loro utilizzo è stato riportato con successo in diversi studi di profiling <sup>155,193,194</sup>.

Una valida alternativa alla tecnologia SELDI è rappresentata dall'utilizzo di biglie magnetiche ricoperte da superfici funzionalmente attivate; questa tecnica è denominata *ClinProt* e, così come la tecnica SELDI, associa la cromatografia all'analisi con spettrometria di massa MALDI-TOF <sup>162,180</sup>. Le due tecniche si basano essenzialmente sugli stessi principi ma il ClinProt permette di utilizzare solo una frazione del campione per l'analisi al MALDI-TOF, cosicché una parte dell'analita resta disponibile per ulteriori approcci analitici con altre strumentazioni e altre tecnologie. La prima pubblicazione scientifica sulla metodica ClinProt risale al 2004 <sup>195</sup>.

La spettrometria di massa permette l'identificazione di possibili biomarcatori in grado di rilevare determinate patologie cliniche e di chiarirne i meccanismi di sviluppo <sup>158</sup>. Molto spesso le malattie insorgono a seguito di alterazioni a livello del proteoma cellulare ed è quindi ragionevole pensare che queste modificazioni possano influenzare fluidi biologici, come urine, plasma, siero e liquido amniotico, determinando una diversa regolazione dell'espressione proteica <sup>157,180</sup>; di conseguenza, queste proteine possono agire da marcatori della patologia in esame. A tal fine, la spettrometria di massa permette di eseguire un'analisi comparata tra soggetti sani e pazienti e di identificare possibili differenze nei profili spettrali delle due popolazioni in esame <sup>163</sup>. È necessario, comunque, purificare precedentemente i fluidi biologici, in modo da eliminare le proteine molto abbondanti, come l'albumina e

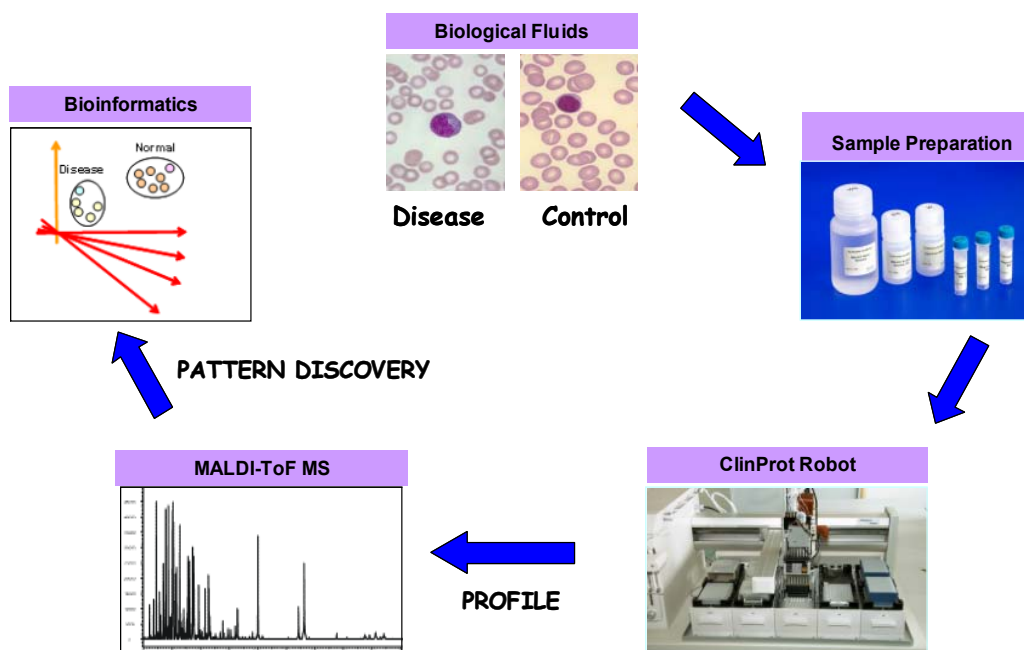
le immunoglobuline, i sali e le piccole molecole che potrebbero interferire con l'analisi spettrometrica <sup>196</sup>; inoltre, data la notevole quantità di specie molecolari che costituiscono il proteoma dei fluidi biologici, si possono avere effetti di soppressione del segnale sulle proteine di interesse <sup>179</sup>.

L'estrazione del proteoma/peptidoma dei fluidi biologici, nella tecnologia ClinProt, è eseguita mediante utilizzo di nanoparticelle magnetiche (*ClinProt beads*) dotate di superfici opportunamente funzionalizzate; quest'ultime, poste a contatto con la miscela complessa, sono in grado di selezionare popolazioni limitate di componenti attraverso alcune possibili interazioni. A tale scopo, esistono diverse tipologie di biglie magnetiche:

- *biglie magnetiche C<sub>3</sub>, C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub>*, che permettono una separazione a fase inversa (*reverse phase*, RP)
- *biglie magnetiche IMAC*, grazie alle quali si esegue una cromatografia di affinità con metalli immobilizzati, quali *Fe* e *Cu*
- *biglie magnetiche a scambio cationico (WCX) e anionico (WAX)*, che permettono, invece, interazioni ioniche
- *biglie funzionalizzate con lectine* (es. concavalina A)
- *biglie magnetiche attivate con anticorpi*, che vengono solitamente utilizzate nelle analisi focalizzate su una singola specifica proteina.

Tutti i processi di purificazione possono essere automatizzati con l'ausilio di un robot, *ClinProt Robot*, il quale permette un efficace prefrazionamento di 96 campioni in soli 90 minuti.

Le proteine e i peptidi estratti con questa tecnologia vengono successivamente analizzati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF e i profili proteici/peptidici acquisiti vengono processati ed elaborati con software statistici (es. *ClinProTools*) per l'individuazione, attraverso algoritmi matematici, di patterns proteici capaci di discriminare i pazienti dai soggetti sani <sup>197</sup> (Figura 11).



**Figura 11.** Schema generale della tecnologia ClinProt associata alla spettrometria di massa MALDI-TOF (Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

L'aspettativa, dunque, è di poter utilizzare la proteomica nell'individuazione di nuovi marcatori biologici per la diagnosi precoce dei tumori <sup>169</sup>. Alcuni potenziali biomarcatori sono già stati identificati e tra questi vi sono, ad esempio, il *PSA*, associato al tumore alla prostata e dal ruolo ancora molto discusso, oppure il *CA-125* per il tumore all'ovaio <sup>186</sup>. Tuttavia, da molti anni ormai, risulta difficile trovare singole proteine coinvolte in una patologia specifica; l'obiettivo attuale è quindi cercare di confrontare l'intero proteoma e identificare più marcatori biologici, analizzando le differenze con sofisticati sistemi di analisi statistica.

Dall'analisi con spettrometria di massa dei campioni in esame si ottiene uno spettro proteico, dove ciascun picco corrisponde ad una determinata proteina. In questo modo, è disponibile per ogni analita un profilo spettrale specifico e, mediante confronto dei diversi spettri, è possibile notare le eventuali differenze di espressione tra il proteoma dei soggetti sani e dei pazienti affetti da tumore. In supporto a questo complesso lavoro di analisi, sono stati creati, come è già stato spiegato, software ed algoritmi matematici che facilitano la visualizzazione e l'elaborazione statistica dei dati, creando potenziali modelli diagnostici da utilizzare in campo clinico <sup>187</sup>.

Sono già descritte, in letteratura, alcune interessanti applicazioni della tecnologia ClinProt che ne risaltano le potenzialità. In un lavoro pubblicato sulla rivista *Clinical Chemistry* nel 2005, questa metodica è stata applicata allo studio dei tumori che colpiscono la cavità orale-orofaringea e dall'analisi statistica dei profili spettrali

ottenuti da campioni di plasma (57 pazienti e 29 controlli) sono emerse numerose differenze di espressione; inoltre, il segnale (massa molecolare 2664 Da) con potenzialità diagnostiche più elevate (sensibilità 100% e specificità 96,6%) è stato identificato come il frammento D175-V200 della catena  $\alpha$  del fibrinogeno <sup>194</sup>. In un lavoro successivo, pubblicato sulla rivista *Clinical Biochemistry* nel 2006, lo stesso team di ricerca ha fornito nuovi promettenti risultati nello studio sui tumori della cavità orale-orofaringea; l'applicazione della tecnologia ClinProt e della Spettrometria di Massa MALDI-TOF su campioni di plasma in eparina (47 pazienti e 28 controlli) ha evidenziato la presenza di dodici possibili marcatori differentemente espressi tra i soggetti sani e i pazienti, che presentano un valore di specificità superiore al 90% e una sensibilità compresa in un range tra 36% e 83%. L'efficacia diagnostica di questi marcatori aumenta significativamente nel caso di un loro utilizzo combinato, raggiungendo le migliori potenzialità con i segnali 2020 Da e 4635 Da (sensibilità 94% e specificità 93%). Inoltre, è stato identificato un frammento della proteina C3 del complemento come potenziale biomarcatore in questa tipologia di tumore <sup>198</sup>.

In un altro articolo pubblicato sulla rivista *European Journal of Cancer* nel 2006, uno studio applicato al cancro del colon-retto con campioni di siero (66 pazienti e 50 controlli) ha portato all'individuazione di un pattern di segnali in grado di discriminare i pazienti dai soggetti sani con buoni valori di sensibilità e di specificità rispettivamente del 95,2% e del 90% <sup>199</sup>.

Sempre nel 2006, in un lavoro di Tolson JP e collaboratori pubblicato sulla rivista *Proteomics*, la tecnologia ClinProt è stata impiegata con buoni risultati in associazione alla metodica SELDI-TOF-MS, al fine di purificare i campioni prima dell'analisi con le ProteinChips. Lo studio è stato indirizzato alla ricerca di possibili marcatori diagnostici per il cancro alla vescica e sono stati analizzati 12 campioni tissutali ottenute mediante biopsia del tessuto tumorale e 12 sezioni di tessuto sano prelevati dagli stessi pazienti. Tre segnali proteici, statisticamente significativi, sono risultati sovraespressi nel tessuto tumorale ed in particolare il segnale con valore  $m/z$  10834 Da è stato identificato come una proteina legante il calcio, la calgranulina A o S100A8, associata generalmente ad uno stato infiammatorio <sup>155</sup>.

## 1.5 LE TECNICHE SEPARATIVE

### 1.5.1 CROMATOGRAFIA

La cromatografia è un metodo di separazione applicabile a campioni costituiti da miscele complesse di diversi elementi; questi vengono dissolti in una fase mobile, che può essere un gas o un liquido, forzata poi a passare attraverso una fase stazionaria immiscibile. Tali fasi sono scelte in modo che i componenti del campione abbiano diversa affinità per ognuna di esse; la fase stazionaria è generalmente costituita da un supporto inerte (matrice) di particelle di piccole dimensioni (3-10  $\mu\text{m}$ ) impaccate in una colonna a cui sono legate molecole con gruppi funzionali specifici, con le quali interagiscono le molecole da separare, senza però formare legami covalenti. Componenti in grado di interagire maggiormente con la fase stazionaria impiegheranno un tempo maggiore ad attraversare la colonna rispetto a componenti con minore affinità per quest'ultima. Dunque i composti che formano la miscela vengono separati gli uni dagli altri durante il passaggio attraverso la fase stazionaria e raggiungeranno il detector a tempi diversi, generando un segnale proporzionale alla loro concentrazione. Per tempo di ritenzione di una sostanza si intende il tempo che passa tra l'iniezione del campione ed il raggiungimento del detector, posto all'uscita della colonna. Quando il rivelatore posto in fondo al sistema registra il passaggio di una sostanza eluita, elabora i dati su di un *cromatogramma*, un tracciato che rappresenta la quantità di sostanza rilevata in funzione del tempo; esso registra una serie di picchi la cui intensità è indicativa della concentrazione della sostanza. La risoluzione del cromatogramma dipende dall'efficienza, dalla selettività e dal fattore di ritenzione. Per avere una buona selettività i picchi del cromatogramma devono essere il più distanti possibili, ovvero sostanze di specie diversa devono avere tempi di ritenzione diversi. Inoltre, è necessario che particelle di una stessa specie vengano eluite con la stessa velocità, di modo che la banda all'interno della colonna cromatografica sia il più stretta possibile.

Con la cromatografia si possono eseguire analisi sia di tipo qualitativo che di tipo quantitativo: l'analisi quantitativa si può basare, per esempio, sulla misura delle aree sottese dai picchi, mentre il punto massimo del picco, che rappresenta il tempo di ritenzione, può essere utilizzato per scopi identificativi. È comunque molto importante eseguire, innanzitutto, un'accurata calibrazione con miscele a contenuto noto, in modo tale da accertare il corretto funzionamento del sistema (standard esterni) e le eventuali perdite di campione (standard interno).

Oggi con il termine cromatografia si indicano in genere tutte le varie tecniche separative, applicabili a miscele di sostanze e basate sulla distribuzione fra due fasi in cui si utilizza uno stesso principio, ossia la diversa velocità con cui i componenti di una miscela migrano in una fase stazionaria sotto l'influenza di una fase mobile.

Oggi esistono vari tipi di cromatografie, generalmente classificate in funzione della natura delle fasi stazionaria e mobile, e le più importanti sono:

- gascromatografia (GC)
- cromatografia liquida (LC)
- cromatografia su strato sottile (TLC)
- cromatografia a scambio ionico (IEC)

Entro queste categorie si possono avere ulteriori suddivisioni. In particolare, la cromatografia liquida si suddivide in cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) e cromatografia liquida classica.

#### **1.5.1.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

La cromatografia liquida ad alta prestazione è una forma di cromatografia liquida che, tramite l'utilizzo di colonne di dimensioni minori rispetto alla LC tradizionale (anche capillari), permette di separare volumi di campione anche molto ridotti in breve tempo; questo sistema necessita però di elevate pressioni. Una tipica strumentazione per HPLC è composta da contenitori con i solventi della fase mobile, un sistema di pompe, un iniettore, una colonna per la separazione ed un detector.

Il campione da analizzare è iniettato all'inizio della colonna cromatografica dove è trascinato attraverso la fase stazionaria dalla fase mobile, applicando pressioni dell'ordine delle centinaia di atmosfere. Per ottenere un'elevata efficienza nella separazione è necessario che le dimensioni delle particelle del riempimento siano molto ridotte ed è indispensabile applicare un'elevata pressione se si vuole mantenere una giusta velocità di flusso dell'eluente e quindi un tempo di analisi conveniente. La lunghezza delle colonne è solitamente compresa tra 10 e 30 cm; il diametro interno è compreso tra 4 e 10 mm, mentre il diametro delle particelle del riempimento tra 3 e 10  $\mu\text{m}$ .

I solventi devono essere privi di impurità e degasati per evitare la formazione di bolle nel circuito che possono inficiare la corretta separazione dei composti; le pompe provvedono a generare una pressione elevata, costante, e possono essere programmate per variare la composizione del solvente durante la separazione. La misurazione del segnale al detector può essere basata su diversi parametri, come il



cambiamento dell'indice di rifrazione, l'assorbimento nell'UV-visibile o l'emissione di fluorescenza dopo eccitazione a determinate lunghezze d'onda.

L'HPLC presenta come vantaggi la possibilità di separare molto rapidamente i composti grazie alla scoperta di nuove tecnologie che permettono di avere colonne molto efficienti, rivelatori più sensibili e nuove pompe adatte ad ottenere una maggiore velocità di flusso della fase mobile. La dimensione ridotta della colonna evita movimenti della fase mobile longitudinali e percorsi alternativi; inoltre la colonna può essere utilizzata per numerosi cicli di analisi. I tempi di lavoro risultano quindi molto brevi e si ha la possibilità di separare sostanze termolabili e sostanze non volatili. Sono necessari volumi molto piccoli di campione (ng) grazie alla elevata sensibilità raggiunta oggi dai rivelatori (ad esempio, gli spettrometri di massa); tutto questo fornisce una maggiore accuratezza e precisione d'analisi e rappresenta un vantaggio fondamentale nel campo delle ricerche biologiche e biochimiche dove la disponibilità di campione è spesso molto limitata.

Per questi motivi l'HPLC ha riscontrato ultimamente notevoli applicazioni, quali la separazione di farmaci e loro metaboliti, vitamine, polifenoli e, in campo proteomico, peptidi.

## **1.6 LA SPETTROMETRIA DI MASSA**

La spettrometria di massa nasce nel 1886, quando Goldstein, un fisico tedesco, scoprì che ioni positivi (raggi canale) fuoriuscivano da un campo elettrico cui era stata applicata una bassa pressione. Nel 1898, Wien mostrò che un raggio di questi ioni poteva essere deflesso da un campo elettrico e un campo magnetico. Tra il 1912 e il 1919, Thompson e Aston perfezionarono i dispositivi usati per lo studio dei raggi canale<sup>200</sup>, costituendo nel 1919 il primo spettrometro di massa. Tale apparecchio fornì ai fisici uno strumento indispensabile per lo studio della struttura atomica della materia. Con esso Aston scoprì l'esistenza degli isotopi, prima dell'elio e poi di un gran numero di altri elementi, misurandone il peso e il numero atomico<sup>201-203</sup>. Nel 1922 Aston ricevette il premio Nobel per la chimica.

La spettrometria di massa consiste in un insieme di tecniche analitiche, particolarmente utilizzate in chimica organica, in grado di fornire informazioni riguardanti:

- la composizione qualitativa e quantitativa di analiti sia organici che inorganici in miscele complesse
- la struttura di una vasta gamma di specie molecolari complesse

- i rapporti isotopici degli atomi nei campioni
- la struttura e la composizione delle superfici solide.

I recenti sviluppi della spettrometria di massa, nell'ambito dello studio di biopolimeri, hanno fornito uno straordinario contributo all'analisi proteomica <sup>158</sup>. Insieme all'elevata selettività, che le permette di riconoscere una determinata sostanza anche se presente in miscela con molte altre, essa è dotata di alta sensibilità (nell'ordine delle femto ( $10^{-15}$ ) o atto ( $10^{-18}$ ) moli), così che spesso è considerata la tecnica d'elezione per l'analisi di sostanze presenti in basse concentrazioni in matrici complesse, quali sono quelle di origine biologica <sup>163</sup>.

Dunque, le applicazioni della spettrometria di massa sono estremamente vaste, ma il suo coinvolgimento di maggior rilevanza nella ricerca biomedica riguarda attualmente la determinazione della struttura delle macromolecole ed in particolare delle proteine. Quando si hanno già sufficienti informazioni strutturali, la determinazione del peso molecolare di un peptide permette la rivelazione di modificazioni post-traduzionali, non sempre prevedibili sulla sola base genomica <sup>166</sup>. Un aspetto fondamentale dell'analisi proteomica è infatti costituito dallo studio del *processing* che il prodotto genico primario subisce, fino al raggiungimento della sua completa e definitiva funzione. Varianti proteiche strutturali e funzionali sono prodotte grazie all'azione di specifici enzimi, coinvolti in un numero elevato di processi cellulari. Fosforilazioni <sup>204</sup>, glicosilazioni e solfatazioni, così come altre modificazioni più rare, sono molto importanti per la determinazione funzionale di una proteina e possono influenzare anche la sua stabilità conformazionale, la localizzazione e l'emivita cellulare.

Uno spettrometro di massa può essere definito come uno strumento analitico in grado di separare molecole e determinarne la massa molecolare in seguito a ionizzazione delle stesse; uno spettrometro di massa inoltre è in grado di fornire informazioni strutturali qualitative, ed in alcuni casi anche quantitative, di una grande varietà di composti.

Una molecola, dunque, per poter essere osservata e misurata nelle sue proprietà di massa, deve essere prima ionizzata. Per ottenere uno spettro di massa, infatti, il requisito essenziale è di produrre ioni in fase gassosa che saranno successivamente accelerati (sino a raggiungere una velocità specifica) mediante un campo elettrico e introdotti in un analizzatore di massa che separa entità di massa su carica diverse ed, infine, rivelare ogni composto dotato di carica e con una certa massa sequenzialmente nel tempo. Mediante la spettrometria di massa è possibile studiare

qualsiasi tipo di composto che sia in grado di essere ionizzato e i cui ioni possano esistere in fase gassosa.

A differenza delle tecniche spettroscopiche, la spettrometria di massa è un metodo d'analisi distruttivo, infatti la molecola non rimane intatta dopo l'analisi, e soprattutto non si basa sull'interazione tra radiazioni e materia <sup>205</sup>.

La capacità di uno spettrometro di massa di differenziare le masse degli ioni è generalmente espressa in termini di *risoluzione R*, definita come:

$$R = m/\Delta m$$

dove  $\Delta m$  è la differenza di massa tra due picchi adiacenti risolti e  $m$  è la massa nominale del primo picco. La massa di un ione è misurata in *dalton (Da)*, che corrisponde a 1/12 della massa dell'isotopo carbonio-12 (<sup>12</sup>C). Due picchi sono considerati separati se l'altezza della valle tra di essi è inferiore ad una certa percentuale della loro altezza (di solito il 10%). La risoluzione richiesta ad uno spettrometro dipende principalmente dal tipo di utilizzo. È comunque importante che lo strumento possieda un potere risolutivo abbastanza elevato ed, in generale, gli spettrometri commerciali hanno risoluzioni che variano tra circa 500 e 500000. Una buona risoluzione consente, quindi, di distinguere bene ioni che differiscono, nel valore di massa molecolare, anche di pochi decimi di dalton.

Uno strumento è definito *a bassa risoluzione* se il suo potere risolutivo inferiore a 5000, ad esempio se è in grado di separare masse unitarie degli ioni fino a 2000  $m/z$  ( $R = 2000/[2000-1999] = 2000$ ). Questo, però, non basta per separare ioni con uguale massa nominale, come CO, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> ed N<sub>2</sub> che forniranno un unico segnale a massa nominale 28. Uno strumento *ad alta risoluzione*, invece, fornisce la massa esatta degli ioni e con  $R = 20000$  può, ad esempio, distinguere tra gli ioni relativi a C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub> (massa esatta 250,1933 Da) e C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>2</sub> (massa esatta 250,1807 Da).

La spettrometria di massa permette di misurare accuratamente il peso molecolare del composto in esame anche fino alla terza o quarta cifra decimale. La massa esatta di uno ione è molto utile, in quanto ne definisce in modo univoco la composizione atomica.

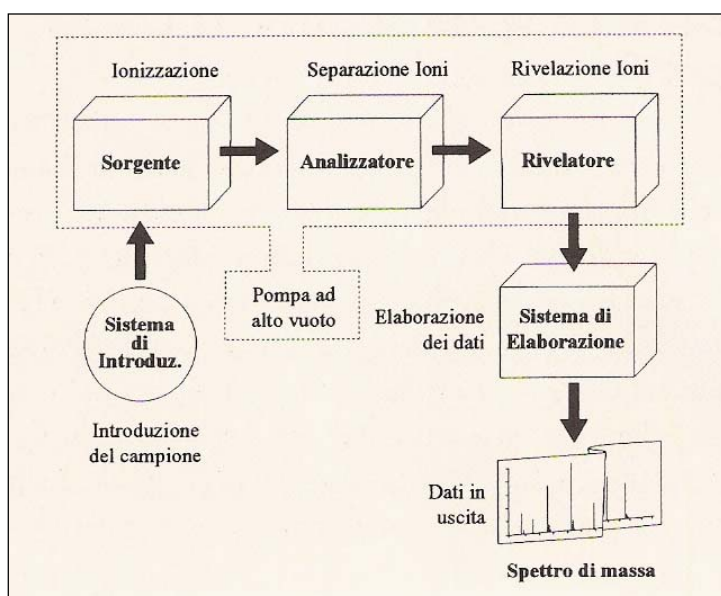
### 1.6.1 LO SPETTROMETRO DI MASSA

Uno spettrometro di massa separa le particelle cariche in funzione del loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ). L'iniziale necessità di formare ioni del campione in fase gassosa per i processi di separazione e rivelazione, ha reso la spettrometria di massa inaccessibile per lungo tempo all'analisi di macromolecole come acidi nucleici e

proteine; questo limite era dovuto al fatto che il processo di ionizzazione avveniva per riscaldamento e bombardamento con particelle, processi che causano nella maggior parte dei casi la distruzione del campione biologico<sup>205</sup>. Attualmente esistono tecniche di ionizzazione cosiddette *soft* ovvero che non causano la distruzione degli acidi nucleici e delle proteine e che rendono quindi possibile l'analisi di queste macromolecole biologiche in fase solida, liquida oppure gassosa. Nel 1988<sup>206,207</sup> infatti, sono nate due nuove tecniche di ionizzazione *soft* differenti fra loro e tuttora ampiamente utilizzate negli studi di proteomica; la tecnica MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*)<sup>208,209</sup>, messa a punto da Hillenkamp F, mediante la quale le proteine vengono ionizzate in seguito ad incorporazione in una matrice capace di assorbire nell'UV e la tecnica ESI (*ElectroSpray Ionization*)<sup>207</sup>, messa a punto da Fenn JB, mediante la quale le proteine in soluzione vengono ionizzate e desorbite ad opera di un intenso campo elettrico.

Queste due nuove tecniche hanno fatto sì che la spettrometria di massa potesse essere utilizzata come strumento per le analisi di proteomica, per il sequenziamento di peptidi, consentendo così di correggere eventuali errori nella sequenza genomica e soprattutto per l'analisi delle modificazioni post-traduzionali, che svolgono un ruolo chiave nella regolazione dell'attività delle proteine e non sono prevedibili sulla sola base genomica.

Questo diagramma a blocchi mostra i componenti principali di uno spettrometro di massa (Figura 12).



**Figura 12.** Schema a blocchi di uno spettrometro di massa (Immagine tratta da "What is MASS SPECTROMETRY", ASMS (American Society for Mass Spectrometry)).

La funzione del *sistema di introduzione* è quella di immettere nello spettrometro una quantità di campione estremamente piccola (fino a una atto mole), i cui componenti

verranno trasformati in ioni gassosi. Il sistema di introduzione del campione è molto importante nei casi in cui la sorgente di ionizzazione lavori sotto alto vuoto; in tal caso il sistema deve essere costruito in modo da non fare perdere il vuoto alla sorgente quando il campione da analizzare viene introdotto nello strumento. Infatti, una caratteristica peculiare degli spettrometri di massa è la necessità di un complesso *sistema ad alto vuoto* che mantenga bassi valori di pressione (da  $10^{-4}$  a  $10^{-8}$  torr) in tutte le componenti dello strumento, eccetto l'elaboratore e il visualizzatore del segnale. Il sistema di alto vuoto è necessario, affinché non vi sia una perdita di ionizzazione per urto con i gas atmosferici.

Il sistema di introduzione del campione viene detto *on-line* nel caso in cui sia interfacciato direttamente con un sistema di separazione, come ad esempio un HPLC o un gas cromatografo, mentre viene detto *off-line* se il campione viene introdotto nello strumento senza l'utilizzo dell'interfaccia con un sistema di separazione.

La *sorgente di ioni* dello spettrometro di massa converte in ioni i componenti del campione per "interazione" con elettroni, molecole, ioni o fotoni; la ionizzazione può essere anche eseguita termicamente o elettricamente. Il sistema di introduzione e la sorgente di ioni sono spesso riuniti in un unico componente, in uscita dal quale si ha un fascio di ioni positivi o negativi (generalmente quello più utilizzato sono gli ioni positivi) che vengono accelerati verso l'analizzatore di massa.

La funzione dell'*analizzatore di massa* è analoga a quella del reticolo di diffrazione in uno spettrometro ottico, ma la dispersione è basata sui rapporti massa/carica (espressi in termini di Da per unità elementare di carica) degli ioni dell'analita anziché sulla lunghezza d'onda dei fotoni. Gli spettrometri di massa sono suddivisi in varie categorie a seconda della natura dell'analizzatore di massa.

Negli spettrometri di massa è presente anche un *rivelatore*, che converte il fascio ionico in un segnale elettrico che può quindi essere elaborato, immagazzinato nella memoria di un computer e presentato. Lo strumento è quindi interfacciato ad un computer che costituisce il sistema di controllo dello spettrometro, in quanto interagisce con questo a diversi livelli permettendo di regolare l'alto vuoto, controllare e modificare i parametri per l'acquisizione e la rivelazione dei dati e di analizzare i risultati ottenuti.

Tutti gli spettrometri sono, dunque, costituiti essenzialmente da tre parti:

- una camera di ionizzazione o sorgente
- un analizzatore

- un rivelatore

Il campione può essere introdotto già sotto forma di gas oppure essere prima vaporizzato nel caso di solidi e liquidi <sup>158</sup>.

#### **1.6.1.1 Sorgente ionica: ionizzazione e frammentazione**

La ionizzazione è il processo a cui sono sottoposte tutte le sostanze introdotte nello spettrometro di massa prima della separazione degli ioni.

Il campione viene ionizzato in un'apposita camera di ionizzazione, in cui il fascio di elettroni è prodotto da una sorgente ionica, che varia a seconda della tecnica utilizzata. Le sorgenti si suddividono in due principali categorie: la prima è costituita dalle *sorgenti in fase gassosa*, nelle quali il campione viene dapprima volatilizzato e i componenti gassosi vengono quindi ionizzati in diverso modo; la seconda comprende le *sorgenti a desorbimento*, che non richiedono la vaporizzazione totale del campione e impiegano quindi una sonda per il campione. Il principale vantaggio della ionizzazione per desorbimento è costituito dal fatto che consente l'analisi di molecole di bassa stabilità termica e non volatili. I diversi metodi di ionizzazione per desorbimento permettono di ottenere spettri di massa di delicate specie biochimiche o di specie con peso molecolare maggiore di 10000 Da. Dunque questi metodi non richiedono la volatilizzazione e la successiva ionizzazione, che sono invece sostituite dalla introduzione di una forma di energia nel campione solido o liquido in modo tale da produrre la formazione diretta di ioni gassosi.

La frazione di elettroni che non urta contro le molecole è raccolta da una trappola per gli elettroni, le molecole che non sono ionizzate sono allontanate dalla pompa ad alto vuoto, mentre quelle ionizzate sono accelerate e convogliate verso l'analizzatore.

Il sistema di ionizzazione è, quindi, molto importante in spettrometria di massa, poiché da esso dipendono il numero, la natura (ione positivo o negativo, ione monocarica, doppia carica, ecc.) e l'abbondanza dei frammenti molecolari che compaiono nello spettro di massa.

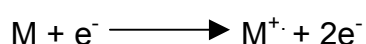
Esistono diverse tecniche di ionizzazione, tra queste le più diffuse sono:

- Ionizzazione per interazione elettronica (*Electron Impact ionization*, EI)
- Ionizzazione chimica (*Chemical Ionization*, CI)
- Ionizzazione chimica a pressione atmosferica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI)
- *Field Desorption* (FD)
- Ionizzazione a bombardamento con atomi veloci (*Fast Atom Bombardment*, FAB)

- Ionizzazione per desorbimento con laser assistita da matrice (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI)
- Ionizzazione elettrospray (*ElectroSpray Ionization*, ESI)

La numerosità delle tecniche attualmente disponibili ha generato, quindi, particolari varianti della spettrometria di massa che vengono utilizzate in base alla natura del campione da analizzare. La principale caratteristica che differenzia le diverse sorgenti è l'energia con cui vengono generati gli ioni: esistono sorgenti *hard* che operano ad elevata energia e portano ad una frammentazione spinta del campione e sorgenti *soft* che invece operano a minore energia e producono una frammentazione molto più limitata del campione. La frammentazione del campione all'interno della sorgente ionica può essere uno strumento utile per ottenere informazioni sulla struttura del composto in analisi, soprattutto nel caso si tratti di molecole organiche di piccole dimensioni, mentre per quanto riguarda l'analisi di proteine l'interpretazione degli spettri ottenuti mediante frammentazione della proteina stessa in sorgente può fornire dati sulla sequenza aminoacidica utili per la sua identificazione, anche se questo tipo di analisi risulta ancora complicato <sup>210</sup>.

La ionizzazione per interazione elettronica (EI) è un metodo di ionizzazione forte, ancora oggi molto utilizzata, adatta per composti piccoli (< 800 Dalton), volatili e termicamente stabili. Il campione viene introdotto in stato di vapore e colpito da un fascio di elettroni che rimuove un elettrone dalla molecola, generando un radicale catione chiamato ione molecolare ( $M^+$ ), secondo la reazione:



Se lo ione molecolare che si genera possiede sufficiente energia, questo può frammentare; per convenzione l'energia del fascio elettronico viene tenuta a 70eV. Questo tipo di sorgente è utilizzata quando lo spettrometro viene interfacciato con un gas cromatografo.

La ionizzazione chimica (CI) è una tecnica di ionizzazione definita *mild*, una via di mezzo tra *hard* e *soft*, che si basa sull'interazione del campione vaporizzato con un reagente ionizzato, solitamente un acido di Brönsted gassoso. I reagenti maggiormente utilizzati derivano dalla ionizzazione ad impatto elettronico del metano, ma possono essere utilizzati anche gas diversi che producono una differente frammentazione del campione: ad esempio se si utilizza l'idrogeno si avrà un'elevata frammentazione, mentre con l'ammoniaca si otterrà una minor

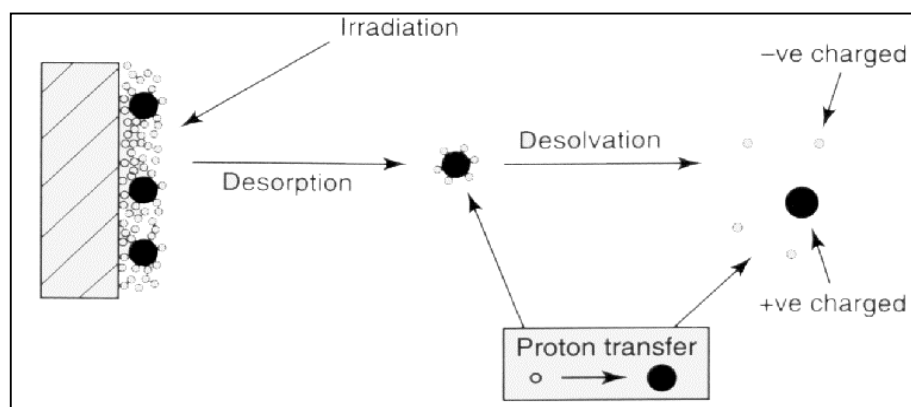
frammentazione. Se la molecola M ha un'affinità per il protone maggiore rispetto a quella del gas, si avrà la formazione dello ione quasimolecolare o pseudomolecolare, che oggi si preferisce chiamare ione molecolare protonato ( $[M+H]^+$ ), il quale possiede una energia tale da portare ad una moderata frammentazione, soprattutto quando la ionizzazione chimica viene eseguita a pressione atmosferica (APCI).

La Field Desorption (FD) è tecnica *soft* che si applica su campioni non volatili; questi vengono depositati sull'anodo di una coppia di elettrodi, tra i quali è presente una forte differenza di potenziale. Avviene il desorbimento dell'analita e vengono prodotti gli ioni molecolare e pseudomolecolare con energia interna insufficiente a provocare una frammentazione.

La ionizzazione a bombardamento con atomi veloci (FAB) è una ionizzazione di tipo *soft* adatta a campioni ad elevato peso molecolare, polari e termicamente labili. Negli anni '80 ha rivoluzionato la spettrometria di massa, introducendola alla biologia ed alla medicina, poiché adatta per l'analisi di peptidi, proteine e altri biopolimeri<sup>211</sup>. Il campione viene prima dissolto in una matrice viscosa (es. glicerolo) e poi depositato; successivamente viene bombardato da un fascio di atomi di xenon o argon ad elevata energia cinetica (8-10 keV).

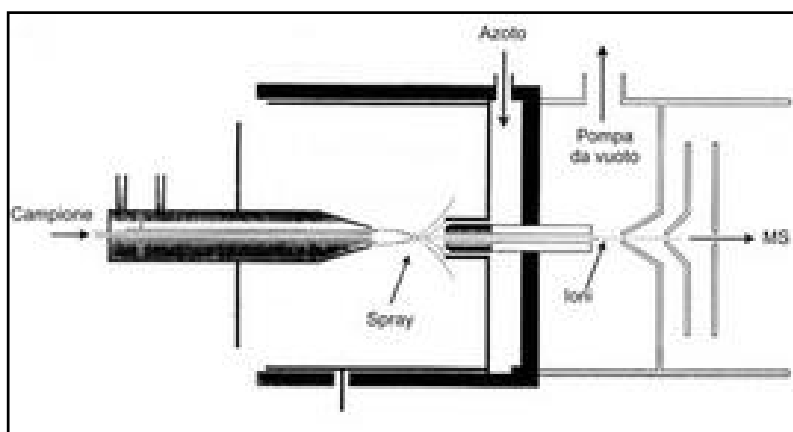
La ionizzazione per desorbimento con laser assistita da matrice (MALDI) (Figura 13) è una tecnica di ionizzazione *soft*, adatta per l'analisi di composti simili a quelli analizzabili con FAB, ma con molti meno limiti nelle dimensioni dell'analita; è infatti possibile generare ioni di molecole che pesano fino a 300 kDa. La tecnica MALDI è basata essenzialmente sulla ionizzazione per desorbimento con laser. Gli analiti sono co-cristallizzati con una matrice solida e il processo di allontanamento dello ione dalla matrice consiste in una irradiazione con laser, il quale permette ad un numero ristretto di molecole posto sulla superficie delle matrici di essere proiettato ad alte velocità nell'analizzatore<sup>209</sup>. Si possono analizzare sia molecole cariche positivamente che molecole cariche negativamente; in genere, si ha il trasferimento di un protone dalla matrice all'analita e, dunque, il processo di osservazione in modalità positiva è quello più frequente. La ionizzazione mediante questa tecnica può avvenire anche a pressione atmosferica (*Atmospheric Pressure- Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*, AP-MALDI). Solitamente questa tecnica è associata a spettrometri basati sul principio del tempo di volo (*Time of Flight*, TOF)<sup>212</sup>.





**Figura 13.** Schema del processo di desorbimento e ionizzazione del campione nella sorgente MALDI (Immagine tratta da “Spettrometria di massa”, Univ degli Studi di Salerno, Facoltà di Medicina).

La ionizzazione elettrospray (ESI) (Figura 14) è una tecnica di ionizzazione *soft*, adatta per composti simili a quelli analizzabili con ionizzazione MALDI. La tecnica ESI utilizza invece un gas inerte (di solito azoto) per determinare un processo di nebulizzazione del campione che è in fase liquida o in soluzione. Nell'ESI la ionizzazione si verifica a pressione atmosferica e sulla specie molecolare si possono depositare più di una carica, formando ioni a multicarica. Questo processo avviene in soluzioni (generalmente di metanolo e acqua), che vengono nebulizzate in una camera a cui è applicato un campo elettrico (ottenuto applicando una elevata differenza di potenziale di diversi kV). La nebulizzazione causa la formazione di piccole goccioline che contengono le specie ionizzate (analita carico). Nella sorgente il solvente evapora, così che le goccioline diventano sempre più piccole sino a che la repulsione elettrica supera la tensione superficiale della goccia. A questo punto la gocciolina si rompe, creando una corrente di ioni che vengono poi indirizzati da un gradiente di campo verso l'analizzatore.



**Figura 14.** Meccanismo di ionizzazione della sorgente ESI (Immagine tratta da [www.federica.unina.it](http://www.federica.unina.it)).

La velocità alla quale vengono accelerati gli ioni dipende esclusivamente dalla loro carica complessiva e dalla forza di accelerazione. Di conseguenza, a parità di forza di accelerazione, maggiore è il numero di cariche, maggiore sarà anche la velocità raggiungibile. Lo spettro ESI di un composto puro rappresenta una distribuzione di picchi (ioni multicarica) derivanti tutti dalla stessa molecola. Successivamente, lo spettro multicarica viene trasformato matematicamente (*deconvoluzione*) dal computer per generare un profilo spettrale, in cui appare il valore di PM della proteina con notevole accuratezza. Inoltre, dato che l'elettrospray risulta particolarmente compatibile con metodiche di separazione in fase liquida, questa tecnica è notevolmente impiegata nell'analisi farmaceutica e biologica<sup>213</sup>.

#### **1.6.1.2 Analizzatore**

L'analizzatore consente di differenziare gli ioni generati in base al loro rapporto massa/carica e poiché nella maggioranza dei casi la carica degli ioni è +1 la separazione avviene sulla base delle rispettive masse ( $m/1$ ). Ioni con differente  $m/z$  escono dall'analizzatore in tempi diversi e di conseguenza raggiungeranno il rivelatore in tempi diversi ed appariranno nello spettro a valori di  $m/z$  differenti.

Esistono diversi tipi di analizzatori, ognuno dei quali è caratterizzato da un differente potere risolutivo; tra questi, quelli attualmente più diffusi sono:

- analizzatori magnetici abbinati ad un separatore elettrostatico
- analizzatori quadrupolari
- analizzatori a tempo di volo (Time Of Flight, TOF)
- analizzatori a trappola ionica
- analizzatori a risonanza ciclotronica ionica in trasformata di Fourier (FT-ICR)

Analizzatori ad elevata risoluzione sono in grado di fornire la massa esatta degli ioni, che è un parametro mediante il quale è possibile, in alcuni casi, definire in maniera univoca la composizione elementare degli ioni corrispondenti.

Tutti gli analizzatori lavorano sotto alto vuoto. Gli analizzatori possono essere classificati, oltre che in base alla risoluzione, anche in base al modo in cui effettuano la separazione e la selezione degli ioni; spesso, inoltre, il tipo di analizzatore adottato viene utilizzato per la classificazione dell'intero spettrometro, in quanto l'analizzatore può essere considerato la componente più importante dello spettrometro di massa.

Gli analizzatori a deflessione magnetica (detti anche a settore) si dividono in settori a *singola focalizzazione* (bassa risoluzione), in cui l'analizzatore sfrutta il solo campo magnetico per effettuare la selezione degli ioni in base al rapporto  $m/z$ , e a *doppia focalizzazione* (elevata risoluzione), composti da un settore elettrostatico, all'interno

del quale gli ioni provenienti dalla sorgente sono focalizzati in base alla loro energia traslazionale, e da un settore magnetico, in cui gli ioni sono separati in base al rapporto  $m/z$ . In quelli a doppia focalizzazione, si possono raggiungere anche risoluzioni fino a 150000.

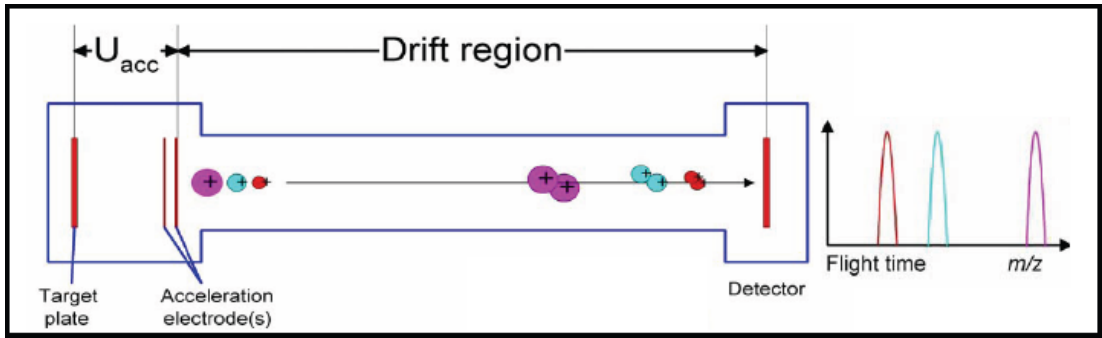
Gli analizzatori quadrupolari hanno solitamente una risoluzione minore (circa 4000) dei sistemi a settore. Sono costituiti da quattro barre di metallo disposte parallelamente; alle barre opposte del quadrupolo è applicata una differenza di potenziale generata da una corrente continua e da una alternata. Solo gli ioni con una traiettoria stabile potranno passare attraverso le barre e raggiungere l'elettromoltiplicatore. A determinati valori di tensione applicata, solo ioni aventi un certo rapporto  $m/z$  usciranno dal quadrupolo; dunque, variando nel tempo la tensione, tutti gli ioni saranno messi in condizione di uscire a tempi diversi dal quadrupolo.

Gli analizzatori a tempo di volo (TOF) (Figura 15) si basano sul principio che ioni di differente valore  $m/z$  hanno uguale energia cinetica ( $E=1/2 mv^2$ ), ma differente velocità dopo l'accelerazione subita nella camera di ionizzazione da un campo elettrico di  $10^3-10^4$  V. Il tempo che ciascun ione impiega ad attraversare l'analizzatore, che è costituito da un tubo (*tubo di deriva*) lungo pochi metri in cui è presente un alto vuoto, è diverso:

$$t = a (m/z)^{1/2} + b$$

Gli ioni che hanno il rapporto  $m/z$  minore giungono al rivelatore prima (tempo di volo minore) di quelli più pesanti. Quindi il tempo di volo è direttamente proporzionale alla massa. I tempi di volo, comunque, variano in genere da 1 a 30  $\mu s$ . Questo analizzatore riesce a coprire un'ampia regione spettrale ed ha un'alta sensibilità. Inoltre, il potere risolutivo può raggiungere anche valori nell'ordine di  $6 \times 10^4$  (*reflectron TOF*).

Negli spettrometri a tempo di volo il rivelatore è generalmente un *moltiplicatore di elettroni* e la presentazione dello spettro di massa è praticamente istantanea.

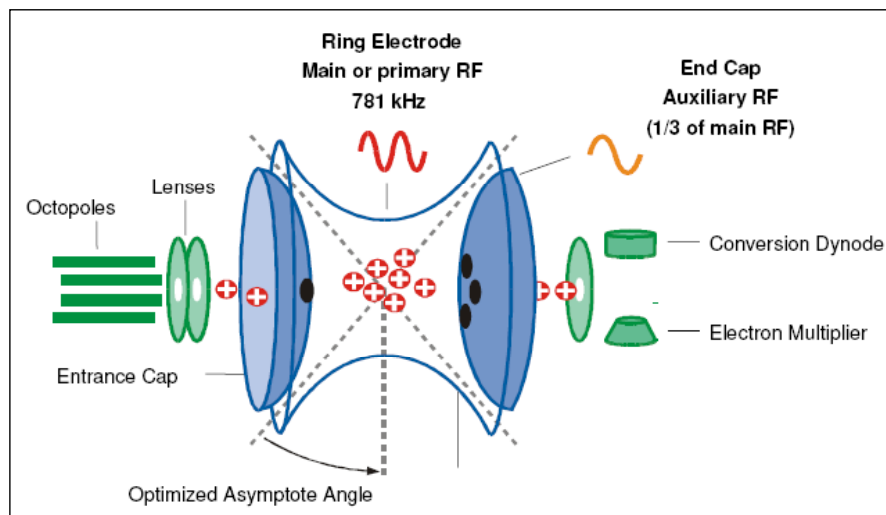


**Figura 15.** Schema di un analizzatore di massa a tempo di volo  
(Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

Gli analizzatori a trappola ionica (ion trap) (Figura 16) sono molto simili a quello quadrupolare, ma in essi il filtro quadrupolare è sferico e trattiene tutti gli ioni generati, i quali vengono poi rilasciati progressivamente verso il rivelatore. La trappola ionica utilizza campi elettrici alternati a radiofrequenza (RF) applicati agli elettrodi disposti in una geometria a “sandwich”, con un elettrodo anulare nel centro e due elettrodi “coperchi” sopra e sotto di esso <sup>214</sup>.

Il dispositivo intrappola nello spazio tra gli elettrodi gli ioni aventi un dato intervallo di rapporti  $m/z$ , determinato dai potenziali applicati. Lo spettro di massa è prodotto variando il potenziale RF in modo da espellere sequenzialmente dalla trappola gli ioni, secondo un ordine di rapporto  $m/z$  crescente.

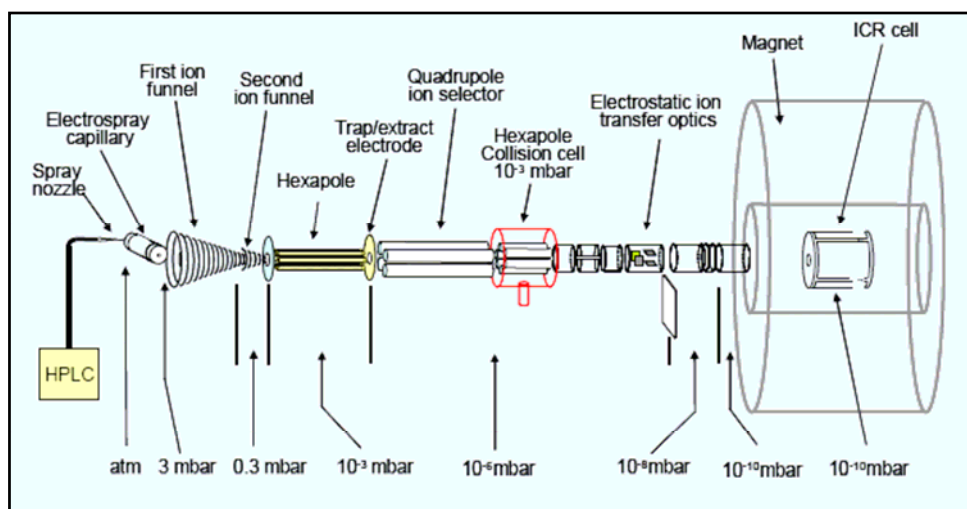
Il potere risolutivo di questo tipo di analizzatore è compreso tra  $10^3$  e  $10^4$ .



**Figura 16.** Schema di un analizzatore a Trappola Ionica  
(Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

Gli analizzatori a risonanza ciclotronica ionica in trasformata di Fourier (FT-ICR) (Figura 17) sono sistemi in cui gli ioni, generati nella sorgente, vengono intrappolati in una cella cubica dove, grazie ad un campo magnetico molto elevato (criomagneti: 4-12 Tesla) unitamente ad un campo elettrico, assumono un'orbita cicloidale con frequenza dipendente dal rapporto  $m/z$ . L'FT-ICR, insieme a un altro recente analizzatore chiamato "Orbitrap", è attualmente al massimo della tecnologia per sensibilità, accuratezza e potere risolutivo ( $10^5$ - $10^7$ )<sup>215,216</sup>. Richiede un vuoto spinto, dell'ordine di  $10^{-9}$ - $10^{-10}$  Torr.

Al fine di eseguire una spettrometria di massa tandem (MS/MS), si possono utilizzare due analizzatore disposti in serie oppure un unico analizzatore in grado di accumulare ioni, come ad esempio una trappola ionica oppure un analizzatore FT-ICR. Quando si utilizza un analizzatore in grado di accumulare ioni, lo ione *parent* viene selezionato e mantenuto all'interno della cella ed in seguito frammentato per collisione; gli ioni prodotto così generati, vengono inviati al rivelatore mediante una scansione. Utilizzando la tecnica MS/MS, è possibile ottenere informazioni utili riguardo la struttura del composto; nel campo della proteomica la spettrometria di massa "tandem" viene utilizzata per analizzare la struttura primaria di oligopeptidi, poiché consente di avere dati sulla composizione e sulla sequenza aminoacidica, basandosi sui ben noti meccanismi di frammentazione.



**Figura 17.** Schema di un sistema FT-ICR MS.

(Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

### 1.6.1.3 Rivelatore

La maggioranza dei rivelatori funzionano ad *impatto ionico* o per *cattura ionica*. Tutti le tipologie richiedono una superficie che raccolga gli ioni e dove la carica venga neutralizzata. Si ha quindi un trasferimento di elettroni ed un flusso di corrente, che

può essere amplificato e convertito in un segnale processabile da un computer; quest'ultimo registra il segnale sottoforma di spettro ( $m/z$ ). Il segnale generato è direttamente proporzionale al numero di ioni che raggiungono il detector e lo spettro di massa è un diagramma che mette in relazione il rapporto massa/carica (asse delle ascisse) con l'abbondanza ionica o "intensità" del segnale degli ioni a diverso  $m/z$  (asse delle ordinate).

### 1.6.2 LA SPETTROMETRIA DI MASSA MALDI-TOF

La spettrometria di massa MALDI-TOF rappresenta la tecnica principale per l'analisi di miscele peptidiche<sup>213,197</sup>. Questa tecnica è stata utilizzata per la prima volta nel 1976<sup>217</sup> e prevedeva la produzione di peptidi intatti in fase gassosa, allo scopo di analizzarli con uno spettrometro di massa; per riuscire a volatilizzarli si dovevano considerare due parametri fisici fondamentali, come la lunghezza d'onda di assorbimento e la volatilità dei peptidi. Tuttavia questo metodo aveva il difetto di non consentire l'analisi di peptidi con peso superiore ai 1000 Da.

MALDI-TOF è un acronimo che indica la modalità di desorbimento/ionizzazione del campione co-cristallizzato con matrici organiche idonee, indotta da fasci di luce laser ed interfacciata con analizzatori a tempo di volo<sup>218</sup>. Tale tecnica è stata introdotta alla fine degli anni '80; Karas<sup>208</sup> e Tanaka<sup>206</sup> proposero, nello stesso anno, l'aggiunta al campione di un largo eccesso di matrice, in grado di assorbire alla lunghezza d'onda del laser in modo da preservare l'analita ed aiutarlo nel processo di ionizzazione.

In seguito si sono ottenuti notevoli miglioramenti, soprattutto grazie agli esperimenti empirici e alle maggiori conoscenze chimico-fisiche riguardo a questa tipologia di ionizzazione.

Numerosi sono i vantaggi nell'utilizzo di questa tecnica:

- applicabilità ad una grande varietà di sostanze
- possibilità di misurare un ampio intervallo di masse contemporaneamente e di misurare molecole con masse molecolari maggiori di 100 kDa
- automatizzabilità
- elevata sensibilità (femtomoli) e risoluzione<sup>219</sup>
- rapidità e semplicità d'utilizzo
- notevole capacità di risolvere, in termini di massa, miscele peptidiche complesse; questo aspetto è dovuto alla produzione di spettri semplici contenenti ioni monocarica  $[M+H]^+$ <sup>220</sup>.

Attualmente la spettrometria di massa MALDI-TOF ha assunto un ruolo fondamentale nel campo della proteomica, grazie alla sua elevata sensibilità e poiché permette analisi molto rapide ed ha una buona tolleranza alla presenza nel campione di sali non volatili e tamponi comunemente utilizzati in biologia. Infatti essa viene spesso utilizzata nelle fasi iniziali dei progetti di proteomica, durante le quali è eseguito uno *screening* per l'identificazione di un gran numero di candidati proteici per le successive e più approfondite analisi; in questa fase risultano essere molto importanti la produttività ed il numero di proteine identificate positivamente.

Le due caratteristiche che, tramite questa metodica, rendono automatizzabili le analisi per l'identificazione delle proteine sono il loro relativamente facile utilizzo e la facile interpretazione degli spettri ottenuti; mediante tecnica di ionizzazione MALDI si ottengono, infatti, quasi esclusivamente ioni monocarica  $[M+H]^+$  <sup>220</sup> (Tabella 10).

Tipologia di Campione	Ioni Positivi	Ioni Negativi
Bassa Polarità	$M^+ // [M+H]^+$	$M^- // [M-H]^-$
Media Polarità	$M^+ [M+H]^+ // [M+Cat]^+ [2M+H]^+$ MW > 3000: $[M+nH]^{n+}$ , n = 2, 3	$M^- [M-H]^- // [2M-H]^-$ MW > 3000: $[M-nH]^{n-}$ , n = 2, 3
Alta Polarità	$[M+H]^+ [M+Cat]^+ // [2M+H]^+ [2M+Cat]^+$ MW > 3000: $[M+nH]^{n+}$ , n = 2, 3	$[M-H]^- // M^- [2M-H]^-$ MW > 3000: $[M-nH]^{n-}$ , n = 2, 3
Ionico $K^+A^-$	$K^+ // [K_n+A_{n-1}]^+ [KA]^+$	$A^- // [A_n+K_{n-1}]^- [KA]^-$
Cat: Cationizzazione tramite $Li^+$ , $Na^+$ , $K^+$ ed altri ioni metallici An: Anionizzazione tramite $Cl^-$ , $Br^-$ , $I^-$ , $HSO_4^-$ ed altri anioni Addotti con la matrice si possono formare con tutti i tipi di analiti, es. $[M+H+matrix]^+$ .		

**Tabella 10.** Principali ioni formati con la tecnica di ionizzazione MALDI in base alla polarità.

Nella modalità *ionizzazione positiva* gli ioni molecolari protonati  $[M+H]^+$  sono in genere le specie più abbondanti. Questa ionizzazione è utilizzata per le analisi di proteine e peptidi.

Nel caso della modalità *ionizzazione negativa* le specie più abbondanti sono gli ioni molecolari deprotonati  $[M-H]^-$ . Questo tipo di ionizzazione viene utilizzata per l'analisi di oligonucleotidi e oligosaccaridi.

Il MALDI-TOF è utilizzato per lo studio di biomolecole con massa molecolare compresa tra 400 e  $350 \times 10^3$  Da ed essendo un metodo molto sensibile, consente di analizzare quantità molto ridotte di campione con un'accuratezza di 0,1-0,01 %.

Prima di ogni misurazione lo strumento deve essere calibrato, costruendo una *curva di calibrazione* mediante utilizzo di un apposito standard (miscele di peptidi o di proteine).

I campioni analizzati possono essere sia solidi sia liquidi non volatili. Questo è possibile, poiché il campione viene depositato su una piastra metallica (*target*), dopo essere stato precedentemente miscelato con la matrice in soluzione. Successivamente, l'evaporazione del solvente determina la co-cristallizzazione del campione con la matrice.

La matrice utilizzata è solitamente un acido organico debole. Essa ha il compito di assorbire la lunghezza d'onda del laser, proteggere ed evitare l'aggregazione dell'analita e desorbire quest'ultimo in maniera indipendente dalle sue caratteristiche intrinseche. Esistono diverse tipologie di matrice adatte a specifiche esigenze di analisi:

- CHCA (Acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico): questa matrice è soprattutto utilizzata negli studi di proteomica ed è utilizzata nell'analisi di proteine e peptidi con un valore di massa fino a 10 kDa, lipidi e carboidrati.
- DHB (Acido 2,5-diidrossi benzoico): questa matrice viene utilizzata nello studio di peptidi, carboidrati neutri e basici, glicolipidi carichi negativamente, polimeri sintetici polari e non polari, e piccole molecole. Negli studi di proteomica viene utilizzata soprattutto nell'analisi di peptidi con massa inferiore a 10 kDa, derivati dalla digestione di proteine glicosilate.
- SA (Acido sinapinico): questa matrice è utilizzata nell'analisi di peptidi e proteine con massa molecolare maggiore di 10 kDa, glicoproteine e proteine di membrana. Nel campo della proteomica viene utilizzato per l'analisi di proteine intatte ed il suo impiego in MALDI-TOF è fondamentale per determinare, con elevata precisione, la massa molecolare di una proteina o per stabilire eventuali modificazioni post-traduzionali di proteine a massa molecolare nota.
- HPA (Acido 3-idrossipicolinico): questa matrice è utilizzata per l'analisi di oligonucleotidi > 3,5 kDa.
- THAP (2,4,6-triidrossiacetofenone): questa matrice è utilizzata nell'analisi di oligonucleotidi < 3,5 kDa.
- PA (Acido picolinico): questa matrice è utilizzata per l'analisi di oligonucleotidi.



- Miscele di HPA e PA: questa matrice è utilizzata per l'analisi di oligonucleotidi > 10 kDa.
- ATT (6-azo2-tiotimina): questa matrice è utilizzata per l'analisi di Ds-DNA.

Una volta selezionata la matrice opportuna, si deve procedere alla scelta del metodo di cristallizzazione da adottare, in quanto anch'esso varia a seconda dell'analita e può influenzare la riuscita dell'esperimento. I due metodi maggiormente utilizzati per le analisi di peptidi sono il *double layer* ed il *dried droplet*. Il *double layer* consiste nel formare un primo strato di matrice sul quale viene in seguito depositato il campione ed un ulteriore strato di matrice; questo tipo di deposito presenta il vantaggio di fornire cristalli omogenei e di piccole dimensioni. Per questa sua caratteristica viene spesso utilizzato per analisi che richiedono una grande precisione in quanto fornisce misure molto riproducibili da uno sparo di laser all'altro, presenta però come difetto una preparazione laboriosa. Il metodo *dried droplet* prevede la miscelazione della matrice con l'analita ed in seguito questa miscela venga depositata sul target; questo metodo genera cristalli di dimensioni maggiori ed eterogenei; lo svantaggio di questo tipo di deposito risiede proprio nell'eterogeneità dei cristalli e nella loro maggiore dimensione in quanto queste caratteristiche influenzano la ionizzazione dell'analita, infatti maggiori sono le dimensioni dei cristalli, maggiore sarà la loro resistenza agli impulsi laser, per questo come risultato si otterranno misure lievemente inferiori per quanto riguarda la precisione. Il vantaggio nell'utilizzo di questo metodo di deposito risiede nella sua facilità di esecuzione e quindi nella possibilità di eseguirlo in maniera automatizzata, per questo motivo è il metodo di deposito maggiormente utilizzato. Una volta eseguito il deposito è possibile inoltre, quando necessario, eseguire una desalificazione del campione direttamente sul *target* mediante l'aggiunta di acqua acidificata sul deposito, questa viene in seguito allontanata, insieme ai sali, ed il campione viene fatto ricristallizzare per aggiunta di matrice.

Il target viene quindi inserito all'interno dello spettrometro di massa mediante un'apertura a tenuta di vuoto; questo permette di evitare che l'aria, entrando nello strumento, determini sia collisioni tra molecole d'aria e ioni accelerati ad alta energia sia reazioni di ossidazione con l'ossigeno.

Per il "bombardamento" dei cristalli di matrice e campione viene utilizzato un fascio di *fotoni ad alta energia*, dunque a bassa lunghezza d'onda; a cui segue la formazione di ioni, derivanti dalla matrice, che provvedono, a loro volta, alla ionizzazione del campione.

Dunque, un altro parametro importante per il desorbimento e la ionizzazione dell'analita è la lunghezza d'onda del laser; la sua scelta dipende dalla matrice utilizzata e dalla natura dell'analita. Il tipo di laser maggiormente utilizzato è il laser ad azoto che emette ad una lunghezza d'onda di 337 nm.

In seguito all'assorbimento di energia, la matrice ionizza e subisce un cambiamento di fase in cui cede la carica ad alcune molecole di analita mediante il trasferimento di un protone; a questo punto, in fase gassosa avviene l'ulteriore ionizzazione delle molecole di analita. La ionizzazione avviene in due fasi distinte chiamate ionizzazione primaria e ionizzazione secondaria<sup>221</sup>; i processi della ionizzazione primaria sono dovuti ad una associazione fra un meccanismo di fotoionizzazione, imputabile ai protoni adsorbiti dalla matrice, ed un meccanismo termico. Il processo di ionizzazione primaria dà come risultato la formazione di molecole di matrice allo stato eccitato. Il processo di ionizzazione secondaria, invece, ha luogo nel plasma di espansione per un processo di trasferimento protonico in fase gassosa; durante questo tipo di trasferimento protonico possono avvenire due tipi di reazione, reazione matrice- matrice e reazione matrice-analita. Durante entrambi i processi di ionizzazione il parametro determinante per la ionizzazione dell'analita è l'affinità protonica; le proteine ed i peptidi hanno una affinità protonica di circa 240 kcal/mol, mentre la maggior parte delle matrici comunemente utilizzate ha valori di affinità protonica inferiori (massimo 223 kcal/mol). Essendo la reazione di protonazione di peptidi e proteine favorita dal punto di vista termodinamico, questa reazione risulta essere preponderante. Il processo è esotermico e l'energia liberata può causare la frammentazione dell'analita; questo permette inoltre di spiegare il processo di frammentazione degli ioni metastabili che viene descritto come una conseguenza dell'aumento di temperatura durante il processo di desorbimento<sup>222</sup>. Se al contrario viene utilizzata una matrice con una affinità protonica uguale o superiore a quella dell'analita, si avrà una diminuzione della frammentazione.

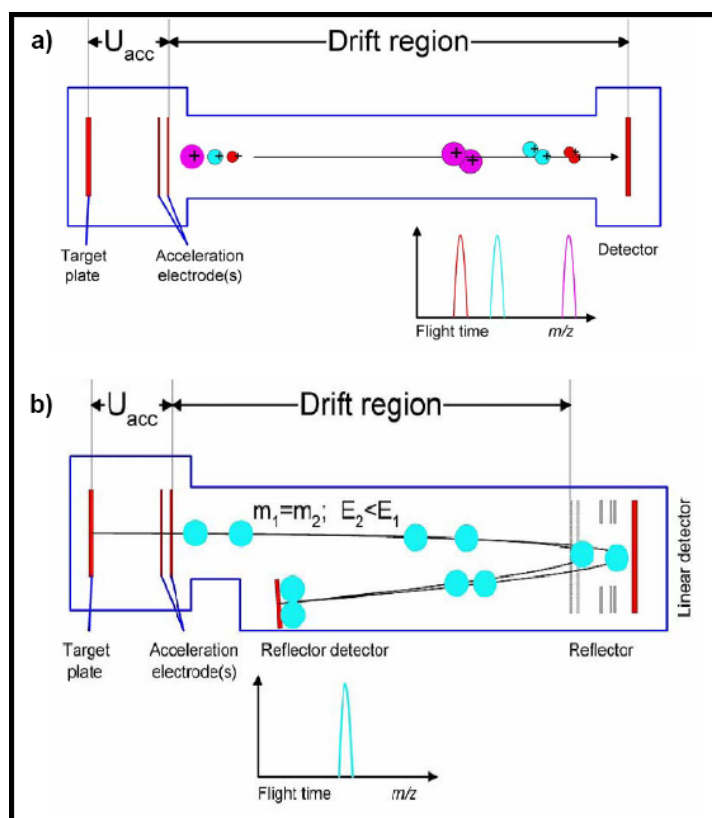
Tra il target (Ion Source 1) ed una piastra metallica presente prima dell'analizzatore (Ion Source 2), viene applicata una differenza di potenziale che causa l'accelerazione degli ioni verso il tubo di volo. Il fascio di ioni molecolari giunge all'analizzatore compatto e convogliato, grazie all'utilizzo di un sistema di lenti.

Gli ioni sono caratterizzati da uguale energia cinetica, ma, avendo massa differente, presentano velocità diverse; dunque, raggiungeranno il detector in tempi diversi. Parlando di ioni monocarica, maggiore è la massa della proteina, più lentamente

questa arriverà al rivelatore. Dunque la velocità di percorrenza del tubo di volo è inversamente proporzionale alla massa dello ione.

Il tempo di volo è il parametro che viene realmente registrato dallo strumento che in un secondo tempo, tramite una apposita calibrazione, fornisce come risultato il valore di  $m/z$  degli ioni. Questo parametro è influenzato dalla lunghezza del tubo di volo la quale, a sua volta, determina il potere risolutivo dello strumento; più è lungo il percorso che gli ioni devono percorrere, migliore sarà la separazione di ioni con massa simile.

L'analisi dei campioni, al MALDI-TOF, può essere eseguita in modalità *lineare* o in *riflessione* (Figura 18). L'analisi in lineare viene impiegata generalmente per campioni ad alto peso molecolare, mentre l'analisi in reflectron è prevista soprattutto per lo studio di proteine a basso peso molecolare o di digeriti triptici.



**Figura 18.** Schema di analizzatori a tempo di volo lineare (a) e reflectron (b).

(Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

L'analizzatore lineare è più semplice dal punto di vista costruttivo, ma ha minor potere risolutivo (1000), mentre il *reflectron* è più complesso, ma fornisce una risoluzione maggiore anche se non è utilizzabile per tutti gli analiti.

Nella modalità in riflessione, viene accoppiato al normale tubo di volo uno specchio elettrostatico con il compito di rallentare, riaccelerare e rifocalizzare gli ioni mediante un gradiente crescente di potenziali; questo permette quindi di aumentare lo spazio che gli ioni devono percorrere per raggiungere il rivelatore ed annullare le eventuali differenze di energia cinetica acquisite dagli ioni aventi uguale rapporto  $m/z$ , a causa di piccole disomogeneità del campo elettrico applicato.

Esso viene utilizzato, infatti, per deviare il percorso degli ioni: gli ioni caratterizzati da una maggiore energia cinetica penetrano maggiormente nel campo elettrico creato da piastre metalliche, caricate ad una particolare differenza di potenziale, rispetto agli altri ioni con minore energia cinetica. Dunque, i primi risultano rallentati nel loro tragitto; questo permette agli ioni con diversa energia cinetica e velocità iniziali differenti, ma rapporto  $m/z$  uguale, di raggiungere nello stesso tempo il rivelatore. Questo sistema, ovviamente, consente una migliore risoluzione dei profili spettrali (può raggiungere un potere risolutivo pari a 20000)<sup>223</sup>, però è adatto unicamente per molecole con massa inferiore a 10 kDa.

Come sopra riportato, in seguito alla formazione degli ioni in sorgente, questi vengono accelerati verso il tubo di volo; questo processo non avviene in continuo, ma gli ioni vengono prodotti ed accelerati a pacchetti discreti. Questi pacchetti vengono accelerati verso il tubo di volo mediante un potenziale decrescente (nel caso di ioni positivi), il quale conferisce a tutti gli ioni la medesima energia cinetica. Gli ioni però all'interno della sorgente non si formano tutti alla stessa distanza dall'inizio del tubo di volo a causa del ritardo che si ha fra la ionizzazione e l'estrazione, questo comporta una piccola differenza nei loro tempi di volo dell'ordine del centinaio di nanosecondi; a questa inoltre va sommata la differenza nel tempo di volo dovuta alla non perfetta omogeneità del campo elettrico applicato. Questi due fenomeni, sommati alle collisioni che possono avvenire fra gli ioni durante il processo di ionizzazione/desorbimento e che causano una dispersione dell'energia cinetica, fanno sì che l'analizzatore lineare abbia una risoluzione bassa e fornisca dei picchi allargati.

L'estrazione ritardata è una tecnica utilizzata per aumentare la risoluzione negli analizzatori TOF. Essa si basa sul principio secondo il quale ioni con velocità iniziali differenti possono essere focalizzati mediante l'uso di potenziali di accelerazione appropriati; l'introduzione di un ritardo comune a tutti gli ioni che si formano in sorgente ne permette la focalizzazione nello spazio correggendo la perdita di risoluzione. L'introduzione di lenti per l'estrazione ritardata ha portato così ad un

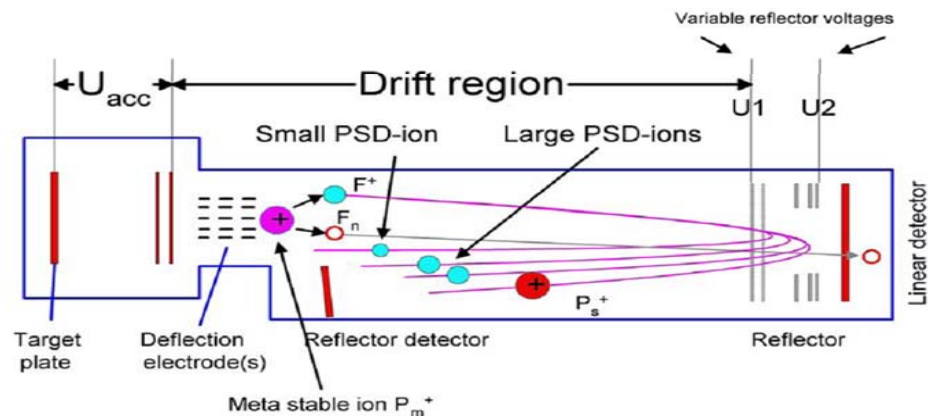
aumento della risoluzione da 1000 a 5000 per gli analizzatori a tempo di volo lineari, ed ha portato ad un considerevole aumento della risoluzione anche per gli analizzatori reflectron che possono così arrivare ad oltre 10000.

L'introduzione del cosiddetto specchio elettrostatico, non solo ha aumentato notevolmente la risoluzione degli analizzatori a tempo di volo, ma ha anche reso possibile il loro utilizzo per analisi MS/MS. Infatti un'altra differenza che si riscontra fra un analizzatore a tempo di volo lineare ed uno reflectron, è che il primo può essere utilizzato solamente per analisi MS, mentre con il secondo sono possibili anche analisi MS/MS, che consentono di ottenere informazioni parziali sulla sequenza di peptidi e proteine.

Per ottenere informazioni sulla sequenza di peptidi, con uno spettrometro di massa MALDI-TOF in modalità *reflectron* si possono utilizzare due metodiche: ISD (*In Source Decay*) e PSD (*Post Source Decay*).

Nell'analisi ISD è di fondamentale importanza il ruolo svolto dall'estrazione ritardata la quale, trattenendo gli ioni in sorgente, aumenta la probabilità di collisione e quindi di frammentazione; gli ioni frammento vengono rifocalizzati dalle lenti di estrazione ed, in seguito all'accelerazione, acquisiscono tutti la medesima energia cinetica iniziale e vengono analizzati in modalità <sup>224</sup>. Con questo tipo di analisi è possibile ottenere informazioni sulla sequenza all'N-terminale di proteine pure ed intatte, oltre che di peptidi.

Per ottenere invece informazioni sulla sequenza di peptidi, si può utilizzare la tecnica del PSD (Figura 19). Negli spettrometri di massa MALDI-TOF con reflectron è possibile ottenere informazioni strutturali dalla frammentazioni degli ioni metastabili all'interno del tubo di volo; questi ioni si trovano ad aver accumulato, durante il processo di ionizzazione, una quantità di energia interna tale da portare alla loro frammentazione all'interno del tubo di volo <sup>225</sup>. Questi ioni prodotto non possono essere separati da un analizzatore lineare, poiché vengono generati all'interno del tubo di volo in assenza di campi elettrici, e quindi avranno la stessa velocità dello ione *parent*; questi frammenti possiedono energie cinetiche differenti che variano a seconda delle loro dimensioni, quindi possono essere separati mediante l'utilizzo del reflectron. Ioni con rapporto *m/z* maggiore penetrano più a fondo nel *reflectron* e raggiungono il rivelatore più tardi rispetto a ioni con *m/z* minore; pertanto la separazione in base al rapporto massa/carica dei frammenti viene effettuata solo dal reflectron.



**Figura 19.** Analisi PSD (Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

Se l'analita è un oligopeptide, questo sarà formato da tutti i picchi generati dalla perdita di uno o più amminoacidi, in seguito a rottura dei legami peptidici, dalla sequenza di partenza, in modo da avere informazioni strutturali aggiuntive rispetto ad uno spettro MS; tale tecnica è anche utile per lo studio di peptidi recanti modificazioni post-traduzionali come la fosforilazione <sup>226</sup>.

Il MALDI-TOF viene utilizzato preferibilmente rispetto ad altri spettrometri di massa, poiché è automatizzabile e consente di ottenere spettri in modo estremamente rapido. Tuttavia questa tecnica presenta alcuni svantaggi, tra cui la soppressione ionica, a causa della quale la copertura di sequenza delle proteine risulta minore rispetto a quella ottenuta con altri spettrometri. Tale fenomeno è dovuto alla differente capacità di ionizzare dei diversi peptidi in una miscela; alcuni di essi, ad esempio quelli particolarmente ricchi in residui acidi, ionizzano meglio di altri provocandone la soppressione nello spettro di massa finale; questo è anche il motivo per cui l'intensità del segnale nello spettro non può essere utilizzata come misura quantitativa dell'abbondanza di un peptide nel campione.

Un ulteriore svantaggio è la scarsa frammentazione ottenibile con la metodica PSD, che attualmente non può competere con quella ottenibile mediante analizzatori a quadrupolo o a trappola ionica.

### **1.6.3 LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA ASSOCIATA ALLA SPETTROMETRIA DI MASSA (LC-MS)**

La tecnica LC-MS è uno strumento potente per l'analisi di peptidi e proteine; questo approccio combina l'efficiente separazione dei componenti del campione eterogeneo di partenza (per esempio una miscela di peptidi derivanti da digestione enzimatica) con l'identificazione sensibile di ogni singolo analita mediante spettrometria di massa

e ricerca in banca dati. Questa metodologia ha aperto la possibilità di interfacciare sistemi separativi con analizzatori di massa di grandi potenzialità come la trappola ionica, il quadrupolo accoppiato al TOF (Q-TOF) e il triplo quadrupolo (QqQ). Nonostante ci siano numerosi metodi per interfacciare la cromatografia liquida alla spettrometria di massa, è stato l'accoppiamento con la ionizzazione electrospray (ESI) <sup>227</sup> a rendere la tecnica LC-MS una procedura abbastanza sensibile per analizzare peptidi e proteine in studi di proteomica.

In una sorgente ESI il campione viene introdotto nello spettrometro direttamente in soluzione e forzato a passare attraverso un capillare insieme ad un gas di nebulizzazione inerte, solitamente azoto (N<sub>2</sub>); il potenziale applicato alla punta del capillare è tale da nebulizzare la soluzione in una miriade di goccioline cariche contenenti il campione. La nebulizzazione ed il processo di evaporazione del solvente vengono coadiuvati da due flussi di gas inerte, uno coassiale al flusso dell'analita (chiamato *nebulizer*) e l'altro, invece, controcorrente rispetto al flusso dell'analita e riscaldato (chiamato *drying gas*). Nella sorgente il gas (*drying gas*) fluisce a bassa velocità e a temperatura relativamente alta, facilitando l'evaporazione del solvente e permettendo di analizzare anche composti termicamente labili come proteine e peptidi in studi di proteomica.

Sono state proposte due teorie differenti per spiegare meglio il processo di ionizzazione *electrospray*; l'unica variazione risiede nell'ultimo passaggio. Una delle teorie più accreditate prevede che man mano che il solvente contenuto nelle goccioline evapora queste si rimpiccioliscono fino a che la repulsione elettrica, aumentata a causa della forte densità elettrica, supera la tensione superficiale della goccia; a questo punto la gocciolina si rompe in gocce più piccole. Il processo si ripete fino alla creazione di una corrente di ioni "nudi" che vengono poi indirizzati da una differenza di potenziale verso l'analizzatore.

Poiché le cariche sono statisticamente distribuite tra i siti disponibili dell' analita, tale tecnica porta spesso alla formazione di ioni a cariche multiple di formula  $[M+nH]^{n+}$  senza frammentazione; se la specie è policarica, dal punto di vista dello spettrometro di massa si comporta come una specie "a massa più bassa", poiché nel rapporto massa/carica, quest'ultima non sarà più uguale a 1, come avviene invece nelle sorgenti MALDI, ma può assumere valori differenti, a seconda della molecola che si sta analizzando; all'aumentare di *z*, il rapporto *m/z* diminuisce e quindi questo processo ha anche l'effetto di abbassare i valori di massa/carica fino a valori facilmente analizzabili da differenti tipi di analizzatori.

Le sorgenti electrospray miniaturizzate, *nano-electrospray* (nano-ESI), lavorano con flussi nell'ordine di nanolitri al minuto <sup>228</sup>, riducendo così al minimo il consumo di solvente, concentrando gli analiti in un volume di eluizione piccolo, aumentando la sensibilità analitica e permettendo quindi analisi con quantità minime di analita; questo la rende particolarmente adatta per il sequenziamento di peptidi o proteine <sup>229</sup>. È quindi possibile analizzare un campione utilizzando un flusso all'interno della sorgente di 50-500 nl/min. Il capillare metallico della sorgente *nano-electrospray* è in silice fusa e ha un diametro interno di 10-15 µm; esso è rivestito esternamente da un sottile strato metallico in modo che possa condurre corrente. La peculiarità di questo tipo di sorgente è rappresentata dalle ridotte dimensioni delle gocce di analita che si vengono a formare, queste hanno una densità di carica superiore ed un rapporto superficie/volume maggiore, questo permette un desorbimento degli ioni più veloce se confrontato con la sorgente electrospray. Un'altra caratteristica della sorgente, anch'essa dovuta alle ridotte dimensioni delle gocce, è che questa non necessita dell'utilizzo dei gas di solvatazione, inoltre la distanza fra il capillare ed il controlettrodo è minore e variabile e la differenza di potenziale applicata è minore, circa 1000 V, in modo da evitare scariche a corona all'interno della sorgente.

Tipicamente, in strumenti con questo tipo di sorgente ionica, fra la sorgente e l'analizzatore di massa vi è una zona che costituisce l'interfaccia; questa assicura la transizione e la focalizzazione degli ioni nel passaggio dalla sorgente, che lavora a pressione atmosferica, e l'analizzatore di massa che si trova invece sotto alto vuoto. L'interfaccia è costituita inizialmente da un capillare di vetro, le estremità ricoperte da un materiale conduttore; a queste estremità è applicata una differenza di potenziale tale da favorire l'attraversamento del capillare da parte degli ioni. Lenti elettrostatiche vengono utilizzate per la focalizzazione del fascio di ioni, cosicché gli ioni sono trasportati all'analizzatore sotto l'effetto dei gradienti di pressione e potenziale. Al processo di focalizzazione degli ioni contribuiscono fortemente anche altri elementi, ad esempio esapoli od ottapoli, che sono barre metalliche alle quali è applicato un potenziale in radiofrequenza; questo permette il convogliamento del fascio di ioni al centro delle barre, le quali trasmettono un fascio di ioni monocinetico verso l'analizzatore. Inoltre nell'interfaccia si trovano anche gli *skimmer*, che hanno il compito di facilitare la definitiva eliminazione dei solventi che possono essere presenti in forma gassosa all'interno dello strumento.

La differenza di potenziale generata fra la sorgente e l'interfaccia accelera gli ioni, che accumulano quindi anche energia interna; questi possono frammentarsi in



seguito alla collisione con molecole di gas residue all'interno dello strumento. Sfruttando questa caratteristica è possibile favorire o meno tale frammentazione, aumentando o diminuendo l'energia con la quale si indirizzano gli ioni verso l'analizzatore.

Generalmente l'analizzatore di massa più utilizzato con una sorgente ionica electrospray è la trappola ionica. In questo tipo di analizzatore, gli ioni vengono accumulati al suo interno prima di essere inviati al rivelatore in seguito ad una loro scansione. La trappola ionica è costituita da due elettrodi a calotta, ai quali viene applicato un potenziale, ed un elettrodo ad anello al quale viene applicato un voltaggio a radiofrequenza. Il volume della trappola è di circa 1 cm<sup>3</sup> e gli ioni entrano ed escono attraverso dei fori presenti sugli elettrodi a calotta. Gli ioni rimangono all'interno della trappola seguendo orbite stabili, fino al momento in cui una data radiofrequenza causa una destabilizzazione che porta gli ioni a fuoriuscire dalla trappola ed andare al rivelatore. Per stabilizzare e destabilizzare le orbite degli ioni all'interno della trappola viene utilizzato un campo elettrico generato da corrente alternata.

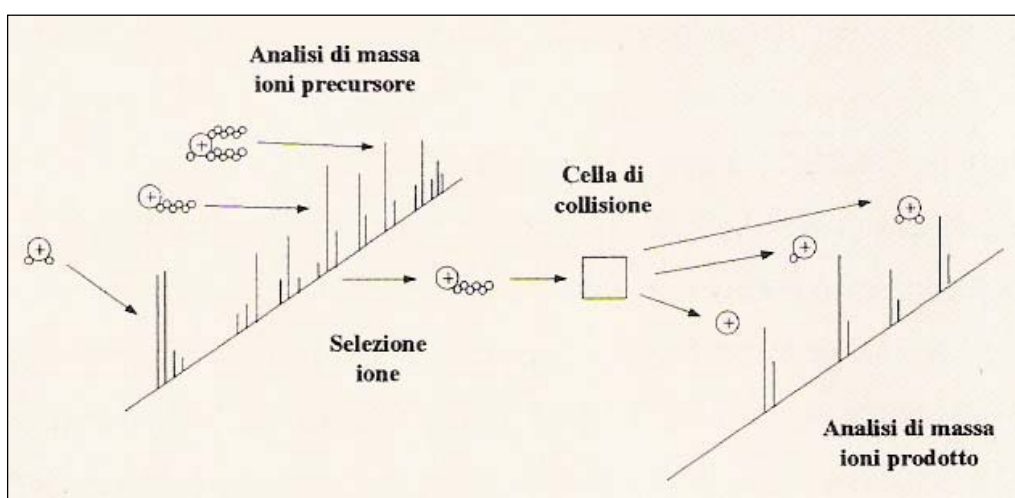
Nella trappola ionica è possibile inoltre isolare gli ioni precursore ed eseguire la loro frammentazione; gli ioni frammentati sono trattenuti all'interno della trappola e poi inviati al rivelatore. Questo tipo di sorgente accoppiata a spettrometri di massa tandem ed alla cromatografia liquida (LC-MS/MS) sta diventando una tecnica sempre più utilizzata per l'identificazione di proteine in quanto purificazione, separazione e concentrazione del campione avvengono in un unico passaggio. Dopo digestione della proteina di interesse, i frammenti peptidici vengono separati in cromatografia liquida e mano a mano che ciascun peptide viene eluito, questo è automaticamente selezionato e frammentato all'interno dello spettrometro di massa. La successiva identificazione è possibile mediante l'utilizzo di algoritmi, che confrontano i dati degli spettri MS e MS/MS con le sequenze presenti in database proteici.

#### **1.6.4 LA SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM (MS/MS)**

Le informazioni strutturali delle molecole sono generalmente ottenute grazie all'utilizzo di spettrometri di massa con analizzatori multipli, noti come *tandem mass spectrometers* (MS/MS), che permettono l'analisi dei prodotti generati dalla frammentazione degli ioni del campione all'interno degli spettrometri di massa<sup>230</sup>. Questa tecnica è utile per determinare la struttura dei composti organici e per il sequenziamento di oligopeptidi, poiché consente di ottenere informazioni sulla

composizione aminoacidica; inoltre, può essere utilizzato anche per determinare la presenza di specifici composti in miscele complesse, basandosi su specifici e caratteristici meccanismi di frammentazione<sup>154,231</sup>.

Uno spettrometro “tandem”, nella forma più semplice, è costituito da due analizzatori disposti in serie (Figura 20). Il primo analizzatore (MS1) ha la funzione di selezionare tra i vari ioni presenti in uno spettro di massa convenzionale lo ione desiderato. Lo ione selezionato viene successivamente fatto collidere con un opportuno gas di collisione (He, Ar) in una cella di collisione e i frammenti ottenuti dalla dissociazione dello ione molecolare vengono separati dal secondo analizzatore (MS2) in base al rapporto  $m/z$ .



**Figura 20.** Nella MS/MS il primo analizzatore seleziona ioni di un particolare valore  $m/z$  per la successiva frammentazione; il secondo analizzatore produce lo spettro di massa dei frammenti ottenuti (Immagine tratta da “What is MASS SPECTROMETRY”, ASMS (American Society for Mass Spectrometry)).

La presenza dell’analizzatore a trappola ionica permette di eseguire un esperimento spettrometrico tandem con “progressione nel tempo”. Questo significa che i processi avvengono nello stesso spazio (trappola), ma in tempi successivi. Infatti, è possibile inizialmente intrappolare tutti gli ioni presenti nello spettro primario per un tempo finito (questo contrariamente alla spettrometria in tandem, nella quale gli ioni che escono dal primo quadrupolo vengono immediatamente accelerati e mandati al detector), successivamente isolare lo ione desiderato espellendo gli altri dalla trappola, indurre la dissociazione ed infine analizzare i frammenti generati all’interno dell’analizzatore stesso. Dunque è possibile decidere quali ioni analizzare, per quanto tempo accumularli e per quanto tempo frammentarli.

Con la trappola si possono ottenere anche spettri di massa multipli, perché lo stesso analizzatore può essere predisposto per effettuare processi successivi di frammentazione.

#### **1.6.4.1 Frammentazione ionica**

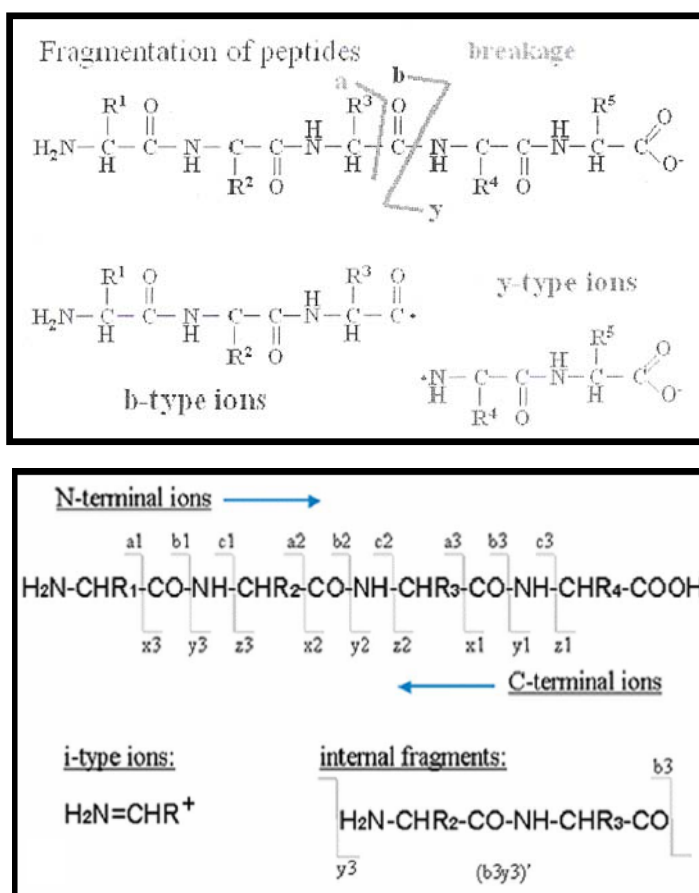
A seguito dell'acquisizione mediante analisi in HPLC-ESI-MS/MS, gli spettri vengono rielaborati ed utilizzati per la ricerca in banca dati.

L'identificazione avviene grazie a speciali algoritmi che mettono in correlazione i dati degli spettri ottenuti MS e MS/MS con le sequenze presenti in database proteici; Questo sistema assicura un'elevata specificità di ricerca, poiché sono disponibili informazioni sui valori  $m/z$  dei peptidi oltre a dati di sequenza, i quali aumentano la "confidenza" dell'identificazione e permettono di eseguire allineamenti con le sequenze già note. È quindi possibile determinare anche le modificazioni post-traduzionali oppure le sostituzioni aminoacidiche di una proteina, in grado di creare differenti isoforme.

L'ottenimento di informazioni sulla sequenza dei peptidi è possibile poiché questi frammentano seguendo regole fisse ed ormai note (Figura 21). Nella cella di collisione possono essere frammentati tre diversi tipi di legame della sequenza amminoacidica, i legami NH-CH, CH-CO e CO-NH. Da ciascun legame si ottengono due frammenti: il primo è neutro mentre l'altro è carico. I peptidi frammentano principalmente a livello del legame peptidico (CO-NH) formando ioni chiamati di tipo  $b$  ed  $y$ ; altri frammenti, ioni di tipo  $a$ ,  $c$ ,  $x$ ,  $z$ , possono generarsi mediante rottura in altre zone del legame peptidico oppure sugli altri legami. Se la carica è trattenuta nella zona N-terminale del peptide, i frammenti ottenuti per frammentazione a bassa energia vengono indicati con le lettere  $a$ ,  $b$ , e  $c$  a seconda della zona del legame peptidico che si rompe, mentre se la carica viene trattenuta nella zona C-terminale del peptide i frammenti vengono indicati con le lettere  $x$ ,  $y$  e  $z$ ; è inoltre possibile avere la formazione di altri ioni,  $v$  e  $w$ , che invece derivano da una frammentazione ad elevata energia delle catene laterali degli aminoacidi<sup>232</sup>. Per poter risalire alla sequenza amminoacidica di un peptide è indispensabile conoscere le regole di frammentazione; soprattutto, utilizzando analizzatori a trappola ionica, si ottengono ioni di tipo  $b$  ed  $y$ .

Il pedice indica il numero di residui aminoacidici contenuti nel frammento, mentre l'apice è a volte utilizzato per indicare le perdite neutre (\* per la perdita di ammoniaca, ° per la perdita di acqua).

Attualmente sono disponibili diversi software che consentono il sequenziamento dei peptidi e grazie a specifici algoritmi per la ricerca in banca dati a partire dai dati sperimentali ottenuti da esperimenti MS/MS.



**Figura 21.** Meccanismo della frammentazione dei peptidi all'interno di uno spettrometro di massa. (Immagine tratta da "Spettrometria di massa", Univ degli Studi di Salerno, Facoltà di Medicina).

### 1.6.5 LO SPETTRO DI MASSA

Lo spettrometro di massa fornisce i risultati sotto forma di uno *spettro di massa* (Figura 22), che consiste in una serie di picchi di intensità variabile; la posizione di ogni picco corrisponde ad un determinato valore di  $m/z$ . In uno spettro di massa, l'asse X riporta i valori di rapporto  $m/z$  e l'asse Y i valori di abbondanza relativa degli ioni analizzati. Le intensità dei picchi sono espresse in percentuali del picco più intenso, il cosiddetto *picco base*, cui si assegna arbitrariamente il valore 100. Gli spettri prodotti sono normalizzati, abbastanza indipendenti dallo strumento impiegato e quindi sono comparabili direttamente. Se la risoluzione dello strumento è sufficientemente elevata, è possibile determinare la massa esatta dei singoli ioni, dalla quale si può dedurre la composizione elementare dello ione stesso. Dallo spettro di MS/MS si può, infatti, risalire alla struttura di un composto sconosciuto,

attribuendo ai singoli ioni una composizione elementare e ricostruendo i meccanismi di frammentazione.

Nell'interpretazione di uno spettro si segue generalmente una determinata procedura:

- Identificazione dello ione molecolare o molecola ionizzata
- Identificazione di ioni caratteristici
- Identificazione di processi di frammentazione caratteristici
- Ricostruzione della struttura della molecola sulla base della conoscenza dei meccanismi di frammentazione standard.

Dunque, uno spettro di massa e, in particolare, la localizzazione del picco molecolare, consentono di ottenere il peso molecolare di una sostanza rapidamente e con assoluta esattezza.

Le qualità che uno spettro di massa acquisito deve avere per poter essere utilizzato sono:

- un buon rapporto segnale/rumore di fondo
- l'intensità dei picchi non deve superare la soglia di acquisizione, poiché in questo caso risulterebbe difficile attribuire loro un valore esatto
- picchi ben risolti, ovvero alti e stretti.

Al termine dell'acquisizione si ottiene uno spettro di massa finale, che viene rielaborato da programmi specifici; quest'ultimi riducono e/o eliminano per sottrazione il rumore di fondo, evidenziano i picchi relativi alla matrice ed i possibili addotti con ioni metallici (principalmente sodio e potassio), infine selezionano i picchi più intensi associando ad essi un valore di  $m/z$ .

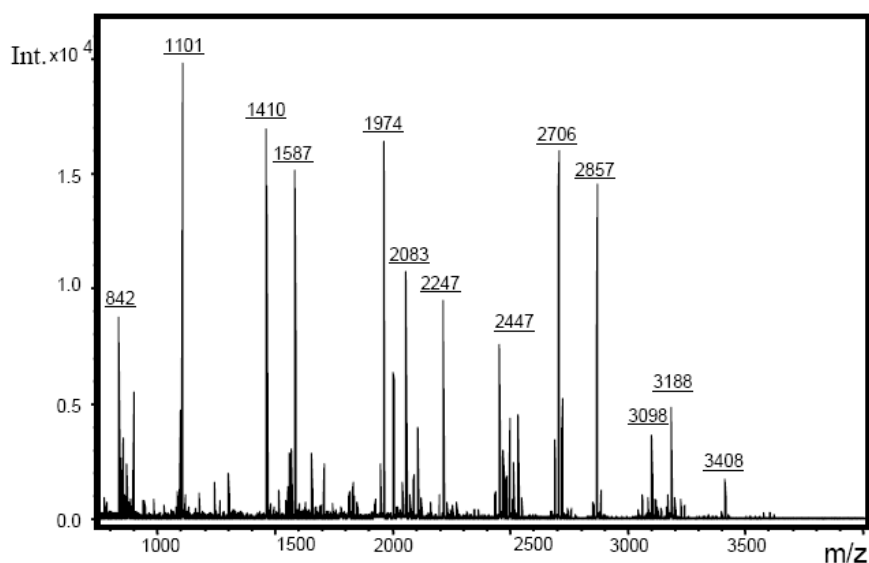


Figura 22. Esempio di spettro di massa.

## CAPITOLO 2

### SCOPO

Il carcinoma a cellule renali (RCC) costituisce circa l'85% dei tumori renali primari e il 3% dei cancri più frequenti che insorgono in età adulta. Il RCC comprende un gruppo di tumori eterogeneo a livello clinico-patologico con svariata prognosi, in cui la variante a cellule chiare (ccRCC) è una delle maggiori cause di morte per cancro e rappresenta il 60-80% dei tumori del rene; negli ultimi anni la sua incidenza è drammaticamente aumentata.

Allo stesso modo la nefropatia diabetica (ND) è la causa principale di insufficienza renale cronica ed una delle cause principali di morbidità e mortalità correlate al diabete mellito (DM). Rappresenta una malattia in costante aumento, dato purtroppo l'altissimo tasso di incidenza a livello mondiale della malattia diabetica.

Dunque risulta fondamentale ed urgente lo sviluppo di nuove procedure diagnostiche e predittive per la ricerca di efficaci marcatori del RCC e della ND, che consentano una migliore comprensione dei meccanismi molecolari alla base di queste patologie; è importante identificare biomarcatori utili nella diagnosi precoce, nella prognosi e nel monitoraggio delle recidive o come possibili target per un eventuale intervento terapeutico.

Gli obiettivi primari della proteomica clinica sono l'identificazione dei meccanismi fisiopatologici della malattia, il controllo dell'efficacia terapeutica e soprattutto la diagnosi precoce; tutto questo è possibile mediante l'identificazione di profili proteici che siano in grado di caratterizzare i soggetti affetti da una determinata patologia rispetto agli individui sani. La proteomica, dunque, rappresenta uno strumento essenziale per la comprensione della funzione dei geni.

Le tecniche impiegate per lo studio del proteoma hanno subito negli ultimi anni un notevole impulso, che ha condotto ad un significativo aumento della sensibilità e specificità dei metodi analitici che le utilizzano. Determinante per tale sviluppo è stata l'evoluzione della bioinformatica che ha contribuito alla implementazione di programmi in grado di elaborare ai fini diagnostici i numerosi dati ottenuti con l'analisi strumentale. Questo è vero sia per le tecniche classiche della proteomica sia per le tecniche più recenti, che prevedono l'utilizzo di processi cromatografici di purificazione prima dell'analisi in MS mediante i quali è possibile caratterizzare biomarcatori multipli. In particolare, tecniche di profiling associate alla spettrometria di massa (MS) consentono di rilevare proteine/peptidi differentemente espressi in

tessuti e fluidi biologici durante i processi fisiologici e patologici. Dunque, la ricerca diretta in fluidi periferici di proteine, la cui espressione risulta alterata per una determinata malattia, rappresenta un valido approccio, poiché tali campioni sono di facile reperimento e possono essere ottenuti in maniera non invasiva.

La diagnosi basata sull'utilizzo di un singolo marcatore è ormai ampiamente riconosciuta essere inadeguata e quindi modelli predittivi multivariati, basati su più marcatori, sono in grado di migliorare la rilevazione del tumore. Pertanto oggi l'interesse è rivolto all'individuazione di marcatori multipli correlabili in maniera specifica ad una determinata patologia.

A differenza di altre metodiche di analisi impiegate in biochimica clinica basate sull'uso di anticorpi (es. ELISA), lo studio mediante MS non necessita di alcuna informazione preventiva riguardante la natura di marcatori specifici per la malattia sotto esame. Infatti l'identificazione di biomarcatori multipli tramite MS prevede il confronto dei profili proteici di popolazioni diverse di individui sani e pazienti con lo scopo di individuarne le differenze di espressione; questo processo è reso oggi possibile grazie allo sviluppo di sofisticati algoritmi matematici la cui qualità influenza la specificità e la selettività dell'analisi.

Data l'elevata complessità dei campioni analizzati e la necessità di eseguire un'analisi proteomica affidabile e di qualità, è essenziale una iniziale procedura di purificazione dei fluidi biologici e i profili spettrali devono essere acquisiti in alta risoluzione. Spesso una fase di pre-frazionamento del campione viene applicata allo scopo di rimuovere interferenti (sali e contaminanti) ed aumentare così il numero di proteine/peptidi rilevabili. In questo modo è possibile ottenere profili proteici da fluidi periferici di pazienti e selezionare da essi un cluster di segnali in grado di distinguere lo stato di malattia. A tal proposito, un approccio innovativo è rappresentato da tecniche di estrazione in fase solida (SPE) basate sul prefrazionamento del proteoma con biglie magnetiche a superficie funzionalizzata. La tecnologia ClinProt, applicata in questi anni di dottorato, rappresenta un utile strumento di profiling grazie alla purificazione dei campioni con microsferi magnetiche, che sono in grado di selezionare gruppi molecolari limitati per la successiva indagine in spettrometria di Massa MALDI-TOF.

Il progetto di ricerca è dunque rivolto allo studio e alla caratterizzazione del proteoma di fluidi periferici (urine e siero) di soggetti sani e pazienti con carcinoma renale o diabetici con e senza nefropatia diabetica, attraverso l'implementazione e l'applicazione di tecniche di profiling basate sull'utilizzo della spettrometria di massa.

Lo scopo infatti è quello di creare profili proteici di riferimento, caratterizzanti i pazienti colpiti da tumore o da nefropatia diabetica, attraverso la combinazione di tecniche di estrazione in fase solida e di strumenti di spettrometria di massa (MALDI-TOF) in modo da poter condurre un'indagine comparativa per la ricerca di eventuali differenze di espressione. Una volta individuate le proteine diversamente espresse è possibile provvedere alla loro identificazione in modo tale da valutare anche il loro ruolo svolto nei meccanismi di insorgenza della malattia.

Nel contesto dello studio del carcinoma renale (RCC), l'obiettivo principale del lavoro è stato quello di indagare mediante tecnologia ClinProt il proteoma di campioni di urine e siero ottenuti da soggetti sani e pazienti RCC.

Per quanto riguarda i campioni di *urine*, questa parte del lavoro ha previsto l'ottimizzazione e l'automatizzazione del protocollo di purificazione con biglie magnetiche WCX e la successiva acquisizione dei profili proteici urinari di una popolazione più ampia rispetto a quella già studiata<sup>233</sup>, con diverse fasi estrattive (C8 e WCX). Il progetto di ricerca è stato poi rivolto alla validazione dell'efficacia diagnostica del cluster di peptidi discriminanti individuato in un mio precedente lavoro<sup>233</sup>, su questa maggior casistica. In aggiunta, sono stati studiati anche altri sottotipi di tumore renale per valutare la specificità dei modelli già determinati e identificarne di nuovi, utili per una diagnosi precoce e per avere una visione più ampia dei meccanismi di insorgenza delle patologie benigne e maligne che colpiscono i reni.

Per l'analisi dei campioni di *siero*, invece, lo scopo è stato quello di caratterizzare il profilo proteico di soggetti controllo e pazienti ccRCC, in modo da individuare efficaci cluster di segnali in grado di discriminare le popolazioni studiate; inoltre è stata verificata la capacità di tali modelli di distinguere i pazienti, mediante il loro raggruppamento in base al stadiazione del tumore, nella fase iniziale.

Allo stesso modo, nell'ambito della ricerca sulla nefropatia diabetica (ND), il seguente lavoro ha avuto come obiettivo quello di studiare il proteoma di campioni di *siero* ottenuti da soggetti sani e pazienti affetti da diabete con e senza nefropatia, al fine di ottenere informazioni che potrebbero consentire una miglior comprensione dei meccanismi patologici alla base del danno renale dovuto a diabete mellito e all'individuazione di marcatori predittivi indicativi di un aumentato rischio di nefropatia diabetica.



## CAPITOLO 3

### **MATERIALI E METODI**

#### **3.1 FLUIDI BIOLOGICI: RACCOLTA DEI CAMPIONI**

Il lavoro di ricerca prevede l'analisi di campioni di urine e siero provenienti da diversi istituti clinici ed ospedalieri. L'interesse dello studio è stato focalizzato sul carcinoma renale e sulla nefropatia diabetica.

##### **MATERIALI:**

- Contenitori in polipropilene con tappo a vite rosso da 120 mL, confezione singola sterile, per la raccolta delle urine (Anicrin s.r.l., Scorzè, Italy).
- Provette coniche Falcon in polipropilene da 50 mL, per la preparazione delle urine.
- Provette vacutainer 10 mL da siero (16x100 PET, con silice micronizzata) Becton Dickinson Italia S.p.A, Buccinasco, Milano, Italy).
- Cryovial sterili tappo a vite chiusura interna e guarnizione da 2 ml 12,5x49 mm in polipropilene con base d'appoggio graduate con zona bianca per scrittura (SIMPORT o BIOSIGMA).

##### **STRUMENTI:**

- Heraeus Biofuge primoR 7590 (Kendro, Germany).
- ALC Refrigerated Centrifuge PK 120 R (ALC International, Milano, Italy).
- Centrifuga refrigerata ALC modello 42333R (ALC International, Milano, Italy).

##### **METODI:**

##### **CARCINOMA RENALE**

I campioni di urine e siero sono stati raccolti da pazienti e soggetti volontari sani presso l'Ospedale di Desio (Desio, Milano, Italy) e il Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università Milano-Bicocca (Monza, Italy). Tutti i volontari sani e i pazienti hanno preventivamente firmato e dato il consenso alla raccolta dei campioni.

##### *Urine*

Le urine dai pazienti con tumore sono state raccolte in contenitori sterili il giorno prima dell'intervento chirurgico (nephrectomia). In aggiunta, sono state ottenute le seconde urine del mattino da volontari sani. Per entrambe le tipologie di campioni è stato raccolto il mitto intermedio, che è stato centrifugato a 3000 rpm per 10 min a 4°C in modo da eliminare i detriti cellulari e i cilindri. Il surnatante recuperato è stato aliquotato e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi.

#### *Siero*

Il sangue prelevato in vacutainer è stato lasciato a temperatura ambiente per 30 minuti, in modo tale da consentire il processo di coagulazione. Successivamente è stato centrifugato a 2000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il siero (circa 2 mL), a questo punto, è stato aliquotato e congelato a -80°C.

### NEFROPATIA DIABETICA

I campioni di siero sono stati raccolti da pazienti e soggetti volontari sani presso l'Ospedale S. Gerardo (Monza, Italy) e l'Ospedale San Raffaele (Milano, Italy). Tutti i volontari sani e i pazienti hanno preventivamente firmato e dato il consenso alla raccolta dei campioni.

#### *Siero*

Il sangue prelevato in vacutainer è stato lasciato riposare overnight a 4°C, in modo tale da consentire il processo di coagulazione. Successivamente è stato centrifugato a 2000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il siero, a questo punto, è stato aliquotato e congelato a -80°C.

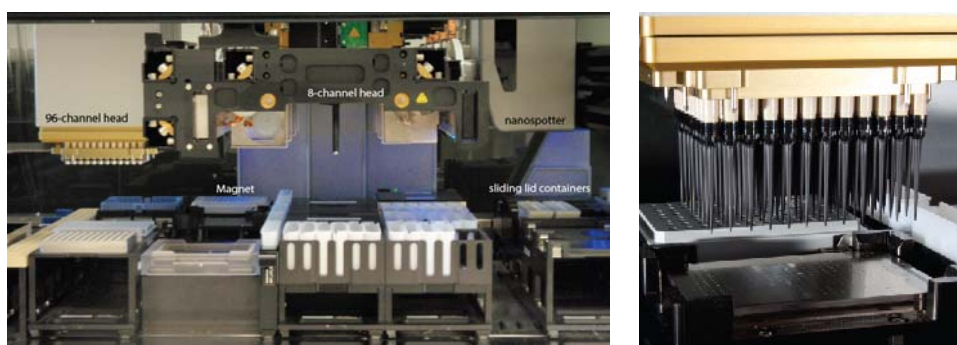
## **3.2 PURIFICAZIONE DEI CAMPIONI**

Il prefrazionamento del proteoma urinario e sierico, prima dell'analisi in MS, è stato eseguito mediante estrazione in fase solida (SPE) con biglie magnetiche a superficie funzionalizzata. La purificazione dei campioni è stata condotta con microsfere a fase inversa C8 (*Hydrophobic Interaction Chromatography*, HIC8) e con biglie a debole scambio cationico (*Weak Cation Ion Exchange*, WCX), utilizzando un ClinProt Robot (Figura 23) e un Robot Hamilton a 96 canali (Figura 24). Entrambi i kit di purificazione sono stati controllati mediante indagine al microscopio ottico, al fine di valutare l'ottimale funzionalità delle sospensioni di biglie. Sono state innanzitutto implementate e ottimizzate le diverse procedure di estrazione dei campioni di urine e

siero, altamente standardizzate e automatizzate, al fine di consentire la caratterizzazione del proteoma dell'intera casistica.



**Figura 23.** ClinProt robot (Bruker Daltonics) con sistema a 8 canali (Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).



**Figura 24.** 96-channel Hamilton STARplus® pipetting robot. Robot con sistema a 96 canali che consente la purificazione simultanea di un'intera piastra (96 pozzetti) e successiva procedura di deposito dei campioni su target metallico per l'analisi in MALDI-TOF (Immagine tratta da [www.hamiltonrobotics.com](http://www.hamiltonrobotics.com)).

### **MATERIALI:**

- MB-HIC 8 profiling kit, contenente biglie magnetiche ad interazione idrofobica C8, *binding solution*, *wash solution* e H<sub>2</sub>O deionizzata (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- WCX MB profiling kit, contenente biglie magnetiche a debole scambio cationico, *binding solution*, *wash solution* e H<sub>2</sub>O deionizzata (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- Metanolo, CH<sub>3</sub>OH (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA).
- Acetonitrile, CH<sub>3</sub>CN (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).
- Acetone, CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).
- Etanolo, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland).
- Acido trifluoroacetico (TFA), CF<sub>3</sub>COOH (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland).
- Idrossido di ammonio, NH<sub>4</sub>OH (J.T. Baker, Deventer, Netherlands).

## **STRUMENTI:**

- Dialux EB-20 (Leitz, Germany).
- ClinProt Robot™ (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- 96-channel Hamilton STARplus® pipetting robot (Hamilton, Bonaduz, Switzerland).
- Bilancia Gibertini E42-B (Gibertini Elettronica, Novate Milanese, Italy).
- Sonicatore Branson 2510 (Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA).
- Vortex (Apparecchi Scientifici E. Pasquali, Milano, Italy).

## **SOFTWARE:**

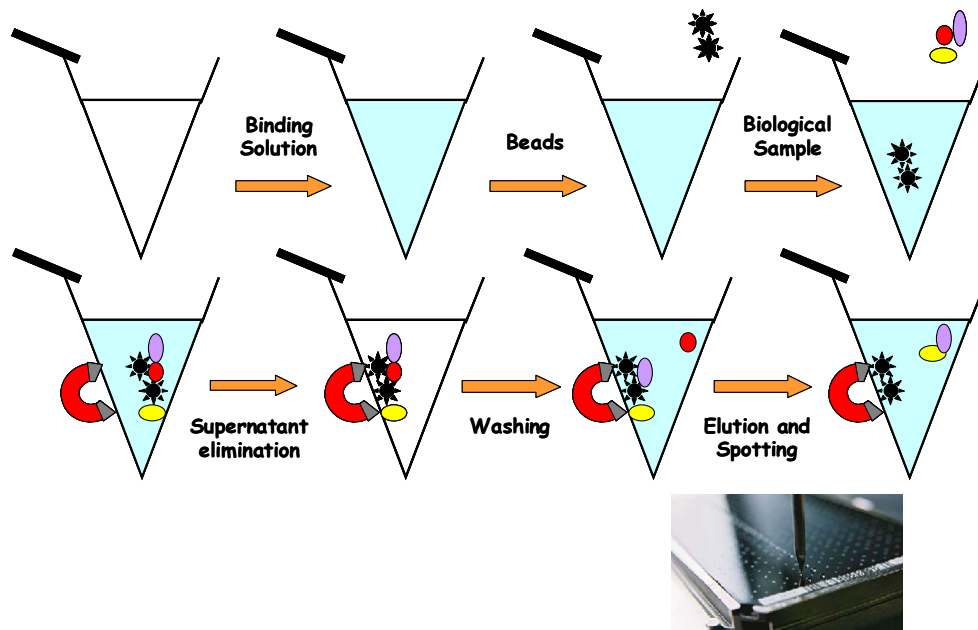
- ClinProt Robot™ software per l'impostazione dei parametri di preparazione dei campioni da parte del robot.
- MICROLAB® VENUS software per l'impostazione dei parametri di preparazione automatizzata dei campioni con il robot Hamilton.

## **METODI:**

Entrambi i kit di profiling sono stati verificati con microscopio ottico, prima del loro impiego, attraverso una valutazione della dispersione e aggregazione presenti nelle sospensioni di biglie magnetiche.

La procedura automatizzata di prefrazionamento dei campioni è basata sull'utilizzo di un Robot ed è costituita dalle seguenti fasi (Figura 25):

- **Binding (fase di legame):** il campione (urine e siero) viene miscelato con una sospensione di biglie magnetiche e una soluzione di legame (fornita dal kit), al fine di ottenere l'estrazione specifica di proteine/peptidi dalla matrice biologica. Segue quindi un periodo di incubazione di circa 1 minuto.
- **Eliminazione del surnatante:** la piastra di lavoro (*workplate*) viene trasferita in un separatore magnetico; in tale che le biglie rimangano adese al magnete e sia quindi possibile prelevare il surnatante, eliminando le sostanze che non si sono legate in modo specifico alle microsferi.
- **Washing (fase di lavaggio):** mediante un tampone di lavaggio vengono eliminate le proteine legate in maniera aspecifica, i sali e i contaminanti, che possono interferire con la successiva analisi in spettrometria di massa; questa fase prevede una serie di tre lavaggi.
- **Elution (fase di eluizione):** vengono aggiunti e miscelati al campione pochi microlitri di una soluzione di eluizione, per consentire la rottura del legame tra proteine/peptidi e biglie magnetiche.



**Figura 25.** Fasi di prefrazione del campione mediante tecnica di estrazione in fase solida (SPE).

### *Urine*

#### MB-HIC 8 profiling kit

Due aliquote di urina (10  $\mu$ L ciascuna) sono state aggiunte a 5  $\mu$ L di biglie e 20  $\mu$ L di *binding buffer*, miscelate e incubate a temperatura ambiente per un minuto. Dopo rimozione del surnatante, le biglie sono state lavate due volte con 45  $\mu$ L e una volta con 15  $\mu$ L di *washing solution*. I peptidi/proteine sono stati poi eluiti con 5  $\mu$ L di una soluzione 50% acetonitrile/H<sub>2</sub>O.

Tutti i passaggi di purificazione sono stati eseguiti in maniera automatizzata con l'ausilio di un robot (ClinProt Robot), così da rendere più veloce il processo di purificazione, ridurre la variabilità dovuta alla preparazione manuale del campione da parte dell'operatore e ottenere una maggiore riproducibilità.

#### WCX MB profiling kit

40  $\mu$ L di urine sono stati aggiunti a 10  $\mu$ L di biglie e 10  $\mu$ L di *binding buffer*, miscelati e incubati a temperatura ambiente per un minuto. Dopo rimozione del surnatante, le biglie sono state lavate più volte con 30  $\mu$ L di *washing solution* e successivamente i peptidi/proteine sono stati eluiti con 15  $\mu$ L di una soluzione di idrossido d'ammonio 130 mM. Gli eluati così ottenuti sono stati subito stabilizzati con 50  $\mu$ L di TFA 3%.

Tutti i passaggi di purificazione sono stati eseguiti in maniera automatizzata con l'ausilio di un robot a 96 canali (Robot Hamilton), che consente la simultanea purificazione di tutti i campioni di un'intera piastra (96 pozzetti).

#### *Siero*

##### MB-HIC 8 profiling kit

Due aliquote di siero (5 µl ciascuna) sono state miscelate con 5 µL di biglie e 10 µL di *binding buffer* e incubate a temperatura ambiente per un minuto. Dopo rimozione del surnatante, le biglie sono state lavate due volte con 45 µL e una volta con 15 µL di *washing solution*. I peptidi/proteine sono stati quindi eluiti con 10 µL di una soluzione 50% acetonitrile/H<sub>2</sub>O.

Tutti i passaggi di purificazione sono stati eseguiti in maniera automatizzata con l'ausilio di un robot (ClinProt Robot).

### **3.3 ANALISI IN SPETTROMETRIA DI MASSA**

#### **MATERIALI:**

- Acido α-ciano-4-idrossicinnamico (CHCA) (Bruker Daltonics GmbH Bremen, Germany).
- Protein Calibration Standard I (ProtMix I) (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- Peptide Calibration Standard II (PepMix II) (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- MALDI-TOF MTP 384 target plate ground steel F (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- MALDI-TOF MTP AnchorChip™ 600/384 target plate (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).

#### **STRUMENTI:**

- Spettrometro di massa MALDI-TOF Reflex IV™ (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- Spettrometro di massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).

## **SOFTWARE:**

- FlexControl™ 2.4 per il controllo dello Spettrometro di Massa MALDI-TOF Reflex IV™ (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- FlexControl™ 3.0 per il controllo dello Spettrometro di Massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).

## **METODI:**

Una aliquota degli eluati di ciascun paziente ottenuti dopo purificazione è stata miscelata, quindi, con una soluzione di matrice (HCCA) e spottati su target metallico per la successiva analisi in spettrometria di massa MALDI-TOF (Figura x). L'aggiunta della matrice e la fase di deposito sono procedure completamente automatizzate eseguite direttamente con il robot. I peptidi/proteine ottenuti vengono miscelati nella *matrixplate* con la soluzione di matrice e, dopo il deposito di alcuni microlitri di questa miscela sul target (AnchorChip o GroundSteel) e l'evaporazione del solvente con cocristallizzazione del campione, si procede con l'analisi in MALDI-TOF MS.

### *Urine*

#### MB-HIC 8 profiling kit

2 µl della frazione di proteine/peptidi eluiti sono stati miscelati con 20 µl di HCCA (0,3 g/L HCCA in etanolo/acetone 2:1) e 0,8 µl di questa miscela sono stati poi depositati in quadruplo sulla piastra di deposito AnchorChip 600/384. Questi passaggi sono stati eseguiti in maniera automatizzata con l'ausilio del ClinProt Robot, in modo tale da rendere uniformi e maggiormente riproducibili i depositi dei campioni. Il target è stato lasciato asciugare a temperatura ambiente (*room temperature*, RT).

#### WCX MB profiling kit

2 µl della frazione di proteine/peptidi eluiti sono stati miscelati con 15 µl di HCCA (0,3 g/L HCCA in etanolo/acetone 2:1) e 1 µl di questa miscela è stato poi depositato direttamente sul target plate AnchorChip 600/384. Quattro depositi per ciascun campione sono stati ottenuti mediante procedura automatizzata con il robot Hamilton a 96 canali. Il target è stato lasciato asciugare a temperatura ambiente.

### *Siero*

#### MB-HIC 8 profiling kit

5 µl della frazione di proteine/peptidi eluiti sono stati miscelati con 10 µl di HCCA (6,2 g/L HCCA in metanolo/acetonitrile/H<sub>2</sub>O 50:40:10) e 1,5 µl di questa miscela sono

stati poi depositati in quadruplo sul target MTP 384 Ground Steel. Questi passaggi sono stati eseguiti in maniera automatizzata con l'ausilio del ClinProt Robot. Il target è stato lasciato asciugare a temperatura ambiente.

La componente di proteine/peptidi eluita da ogni campione e non depositata sul target è stata riunita con gli altri eluati della popolazione di appartenenza (controlli e pazienti in base alla patologia); le varie aliquote sono state quindi congelate e conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi in HPLC-ESI-MS/MS per l'identificazione di potenziali marcatori.

Prima di procedere all'acquisizione dei profili proteici dei campioni, viene eseguita una calibrazione esterna dello spettrometro di massa MALDI-TOF; esistono miscele di calibrazione diverse a seconda dell'intervallo di valori di  $m/z$  in cui ricade la massa molecolare del campione da analizzare. Durante questo studio è stata utilizzata la miscela di calibrazione *ProtMix I*, che copre un range di massa molecolare tra ~4000 e 20000 Da, per calibrare lo strumento in modalità lineare (Tabella 11). La miscela di proteine/peptidi standard *PepMix II* (~700-3500 Da) è, invece, stata impiegata in modalità reflectron per ottenere i valori accurati delle masse molecolari dei composti presenti nel campione analizzato (Tabella 12).

PROTEINA	PROTONAZIONE	$m/z$ MEDIO
<i>Insulina</i>	$[M + H]^+$	5734,51
<i>Ubiquitina I</i>	$[M + H]^+$	8565,76
<i>Citocromo C</i>	$[M + H]^+$	12360,97
<i>Mioglobina</i>	$[M + H]^+$	16952,30
<i>Citocromo C</i>	$[M + 2H]^{2+}$	6180,99
<i>Mioglobina</i>	$[M + 2H]^{2+}$	8476,65

**Tabella 11.** Peptidi componenti la miscela di calibrazione ProtMix I e relativi valori medi di  $m/z$ .



<b>PROTEINA</b>	<b>[M + H]<sup>+</sup> m/z MONOISOTOPICO</b>	<b>[M + H]<sup>+</sup> m/z MEDIO</b>
<b><i>Bradichinina 1-7</i></b>	757,3992	757,86
<b><i>Angiotensina II</i></b>	1046,5418	1047,19
<b><i>Angiotensina I</i></b>	1296,6848	1297,49
<b><i>Sostanza P</i></b>	1347,7354	1348,64
<b><i>Bombesina</i></b>	1619,8223	1620,86
<b><i>Substrato renina</i></b>	1758,9326	1760,03
<b><i>ACTH frammento 1-17</i></b>	2093,0862	2094,43
<b><i>ACTH frammento 18-39</i></b>	2465,1983	2466,68
<b><i>Somatostatina 28</i></b>	3147,4710	3149,57

**Tabella 12.** Peptidi componenti la miscela di calibrazione PepMix II e relativi valori di *m/z*.

Questi polipeptidi, che possiedono valori di massa noti, servono per costruire una curva di calibrazione per convertire i tempi di volo (ns) in valori di *m/z*. Questa operazione viene ripetuta ogni volta che viene utilizzato lo strumento poiché i valori di vuoto, che influenzano sensibilmente i tempi di volo degli ioni, possono variare da un'analisi all'altra.

Al fine di ottenere profili spettrali di ottima qualità e una veloce acquisizione in spettrometria di massa, l'analisi è stata eseguita con il pacchetto *AutoXecute* del software *FlexControl*<sup>TM</sup>. Sono stati programmati diversi metodi di acquisizione automatica per ogni tipo di fluido in esame e di biglie utilizzate; è stato quindi possibile impostare i parametri necessari per acquisire gli spettri di massa dei campioni, valutarne la qualità e scartare quelli con scarsa risoluzione e basso rapporto segnale/rumore di fondo (S/N) includendo invece nella sommatoria solo i profili migliori.

L'acquisizione viene eseguita sommando spettri ottenuti da "spari" (bombardamenti con fotoni) successivi in posizioni diverse del pozzetto in cui è stato depositato il campione; in questo modo si riesce a migliorare il rapporto S/N dello spettro. Poiché la matrice non cristallizza in modo uniforme è importante che venga analizzato tutto il pozzetto contenente il campione per poter ottenere il maggior numero di informazioni ed il più possibile riproducibili.

## Spettrometro di massa MALDI-TOF Reflex IV™

L'acquisizione dei campioni è stata eseguita in modalità lineare e reflectron.

In modalità lineare, lo strumento è stato precedentemente impostato su questi valori:

- ion source 1 = 20 kV
- ion source 2 = 18,25 kV
- lens = 8,70 kV
- pulsed ion extraction = 400 ns
- medium gating strength con matrix suppression = 700 Da

In modalità reflectron, invece, i parametri impostati sono i seguenti:

- ion source 1 = 20 kV
- ion source 2 = 16,75 kV
- lens = 8,90 kV
- pulsed ion extraction = 400 ns
- deflection mode con matrix suppression = 600 Da

La ionizzazione è stata eseguita utilizzando una sorgente laser ad azoto con una frequenza di 10 Hz.

### *Urine*

A seguito dell'estrazione con biglie magnetiche C8, i campioni sono stati analizzati in MALDI-TOF in modalità positiva lineare. L'acquisizione degli spettri è stata effettuata in modalità positiva lineare in un intervallo di massa 1000-10000 Da.

Sono stati sommati i migliori otto spettri ottenuti da posizioni differenti all'interno di ciascun deposito mediante 70 spari (*shots*) con il laser per un totale di 560 *shots*. L'eccesso di matrice eventualmente presente nei cristalli dei campioni è stato rimosso grazie a 5 laser *shots* ad una potenza più elevata (45%) prima della successiva acquisizione degli spettri a potenza inferiore (33-40%).

### *Siero*

Tutti i campioni, dopo purificazione con biglie magnetiche C8, sono stati analizzati in MALDI-TOF in modalità positiva lineare e reflectron. Gli spettri in lineare sono stati acquisiti in un range di massa 1000-10000 Da, mentre per l'analisi in reflectron il range è stato impostato a 760–4200 Da.

In lineare, sono sempre stati sommati i migliori otto spettri ottenuti da posizioni differenti all'interno di ciascun deposito mediante 70 laser *shots* per un totale di 560 *shots*. L'eccesso di matrice è stato rimosso con 15 laser *shots* ad una potenza

elevata (90%) prima della successiva acquisizione degli spettri a potenza più bassa (50-58%).

La misurazione in reflectron ha permesso di ottenere le masse accurate dei potenziali marcatori individuati durante l'analisi statistica dei profili spettrali precedentemente ottenuti in modalità lineare. L'acquisizione è stata effettuata manualmente, per verificare che gli spettri fossero tutti ben calibrati e per monitorare che i segnali fossero ben risolti.

In entrambi i metodi di acquisizione, la rilevazione dei picchi presenti negli spettri era basata sull'utilizzo dell'algoritmo centroide con una percentuale di altezza rispetto alla linea base di 80% e una soglia S/N uguale a 6; la risoluzione minima è stata impostata a 400.

#### Spettrometro di massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex II

L'acquisizione dei campioni è stata eseguita in modalità lineare.

Lo strumento è stato impostato sui seguenti parametri:

- ion source 1 = 24,98 kV
- ion source 2 = 23,68 kV
- lens = 6,6 kV
- pulsed ion extraction = 100 ns
- high gating strength con matrix suppression = 700 Da

Il processo di ionizzazione è stato condotto utilizzando un laser Smartbeam™ ad una frequenza di 100 Hz.

#### *Urine*

I campioni, ottenuti dall'estrazione con biglie a debole scambio cationico (WCX), sono stati analizzati in MALDI-TOF in modalità positiva lineare. I profili dei campioni sono stati acquisiti in modalità positiva lineare in un intervallo di massa 1000-12000 Da.

Per ciascun campione, lo spettro finale corrisponde alla somma dei migliori profili spettrali ottenuti da venti differenti posizioni all'interno del deposito (60 laser *shots* per un totale di 1200). I dati sono stati acquisiti ad una potenza laser di 45%.

La rilevazione dei picchi presenti negli spettri era basata sull'utilizzo dell'algoritmo "centroide" con:

- una percentuale di altezza rispetto alla linea base di 80%
- una soglia S/N uguale a 2
- una risoluzione maggiore di 100 per la valutazione e la selezione degli spettri di miglior qualità.

### **3.4 ANALISI BIOINFORMATICA**

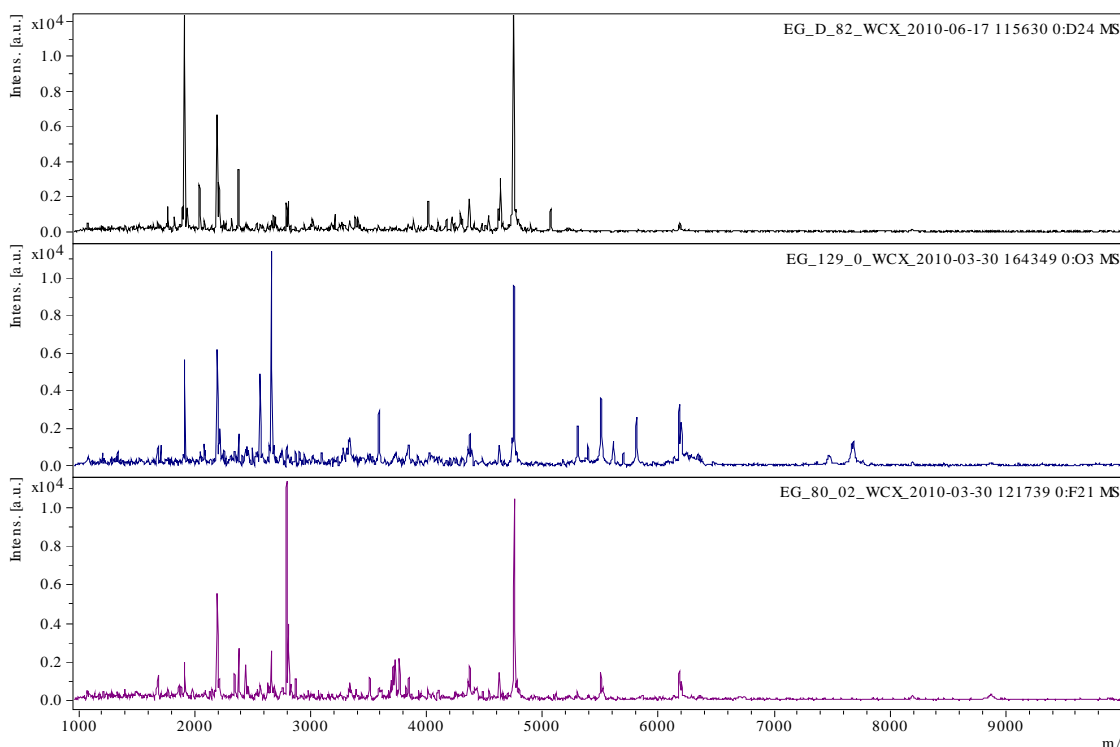
#### **SOFTWARE:**

- FlexAnalysis™ 3.3 per l'elaborazione degli spettri acquisiti al MALDI-TOF (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- ClinProTools™ 2.2 per l'indagine statistica degli spettri e la visualizzazione delle differenze di espressione (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany).
- Rapid Miner software 4.4
- MedCalc® (v 10.4.0.0) per l'analisi statistica degli spettri.

#### **METODI:**

##### **Software FLEXANALYSIS™**

Il software FlexAnalysis™ consente l'elaborazione degli spettri acquisiti con lo spettrometro di massa MALDI-TOF, al fine di migliorarne ulteriormente la qualità. Innanzitutto, permette di visualizzare tutti gli spettri acquisiti singolarmente o su più finestre (Figura 26), in modo da eseguire una prima analisi prettamente visiva degli spettri e delle differenze di segnale. Qualora siano presenti spettri non soddisfacenti (segnali poco intensi e in scarso numero, segnale del rumore di fondo elevato oppure *shots* insufficienti) o non acquisiti in automatico dallo strumento, è eventualmente possibile riacquisirli inserendo nuovamente il target nello spettrometro.



**Figura 26.** Schermata del software FlexAnalysis™ in cui è impostata la visualizzazione degli spettri su più finestre.

Gli spettri acquisiti in MALDI-TOF sono stati, quindi, elaborati, al fine di ridurre la varianza sperimentale entro il *dataset* prima della successiva analisi statistica; la procedura prevedeva una correzione della linea di base mediante algoritmo “Top Hat” e un allineamento degli spettri. È possibile eseguire l’allineamento con uno spettro già acquisito e calibrato in una precedente analisi; non è infatti necessario che le masse misurate in lineare siano accurate, ma piuttosto che i picchi ottenuti da diversi campioni in differenti analisi siano fra loro sovrapponibili e, di conseguenza, comparabili. Nel caso si lavori in modalità reflectron è, invece, fondamentale avere un’accuratezza di massa negli spettri acquisiti, dunque è necessario eseguire una calibrazione interna dei profili spettrali mediante una lista di picchi già noti in letteratura.

Con tale software è inoltre possibile ottenere i valori di massa dei picchi presenti negli spettri in esame mediante utilizzo di alcuni algoritmi (Apex, Centroid, Sum e Snap); questi ultimi consentono diverse modalità di assegnazione dei valori di massa e permettono di calcolare i corrispondenti rapporti  $m/z$  oltre ad altri parametri quali, ad esempio, intensità e risoluzione di ciascun picco.

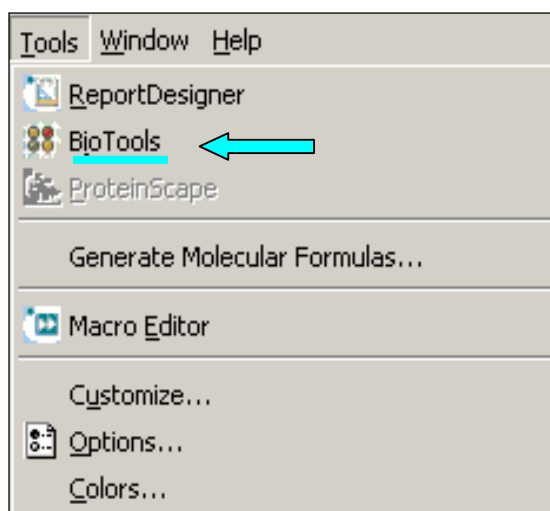
L’algoritmo Apex consente di visualizzare tutti i valori di massa dei picchi in corrispondenza di ogni apice e utilizza le derivate prima e seconda per rilevare i picchi. In particolare, per determinare la posizione esatte del picco si serve di una

interpolazione della derivata prima. È necessario impostare alcuni parametri, tra cui l'intensità relativa, l'ampiezza minima di un segnale (*peak width*) affinché sia identificato come picco (es. 0,1  $m/z$ ; se  $< 0,1 m/z$  è rumore di fondo) e la soglia segnale/rumore (mai  $< 3$ ). Il parametro *peak width* è un indice che permette di accettare positivamente solo i segnali che presentano un valore uguale o maggiore a quello impostato ed è molto importante poiché se tale parametro è impostato ad un valore troppo elevato, c'è il rischio che i segnali bassi siano considerati come rumore. L'algoritmo Centroide calcola il valore di massa nella parte media del segnale ad una determinata altezza; è possibile quindi impostare la percentuale di altezza che il software deve considerare rispetto alla linea di base (valore generalmente raccomandato è 80%). Questo algoritmo utilizza lo stesso meccanismo di calcolo dell'algoritmo Apex, tuttavia risulta più accurato, poiché quando i picchi si presentano frastagliati un valore  $m/z$  calcolato in corrispondenza degli apici risulta poco affidabile.

Sum calcola le cosiddette "pseudo derivate", invece delle reali derivate calcolate dagli algoritmi Apex e Centroide. Se il valore della pseudo derivata supera una certa soglia, il picco è considerato come tale. Inoltre, Sum esegue una correzione interna della linea di base e un calcolo del rumore di fondo, al fine di selezionare correttamente i picchi e quantificare i rapporti segnale/rumore.

Snap, infine, rappresenta l'algoritmo migliore per un'analisi di spettrometria di massa su peptidi. Questo algoritmo considera il cluster isotopico di ogni peptide e calcola le masse monoisotopiche, utili per un successivo chiarimento sulla struttura e sequenza di un particolare peptide; inoltre esegue automaticamente una correzione interna della linea di base e una determinazione del rumore. È opportuno, quindi, utilizzare Snap solo con dati grezzi non processati precedentemente, su quali non è mai stata eseguita una sottrazione della linea di base o uno smoothing. Anche in questo caso è necessario impostare alcuni parametri, tra cui l'intensità relativa, la soglia segnale/rumore, il numero massimo di picchi considerati ed, infine, il fattore di qualità che indica quanto il picco reale si discosta da quello isotopico.

Infine, da questo software è possibile collegarsi al motore di ricerca Mascot attraverso l'interfaccia *BioTools*, al fine di identificare le proteine o i peptidi di interesse (Figura 27).



**Figura 27.** Collegamento al motore di ricerca MASCOT mediante l'interfaccia *BioTools* dal menu Tools di FlexAnalysis™ (Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

### Software CLINPROTOOLS™

Gli spettri sono stati successivamente elaborati con il software statistico ClinProTools™, che permette un confronto tra spettri multipli e la rilevazione e visualizzazione di pattern proteici in grado di discriminare le popolazioni di studio; infatti, consente di svolgere le seguenti operazioni:

- visualizzazione simultanea di un elevato numero di spettri;
- creazione di modelli predittivi per la selezione dei picchi, in base sia all'ispezione visiva sia all'utilizzo di algoritmi matematici multipli per il riconoscimento di possibili biomarkers;
- validazione dei modelli diagnostici di un cluster di analisi, utilizzando campioni di prova, al fine di determinare la sensibilità e la specificità degli stessi;
- riconoscimento e classificazione di campioni sconosciuti, utilizzando i modelli di analisi di interesse.

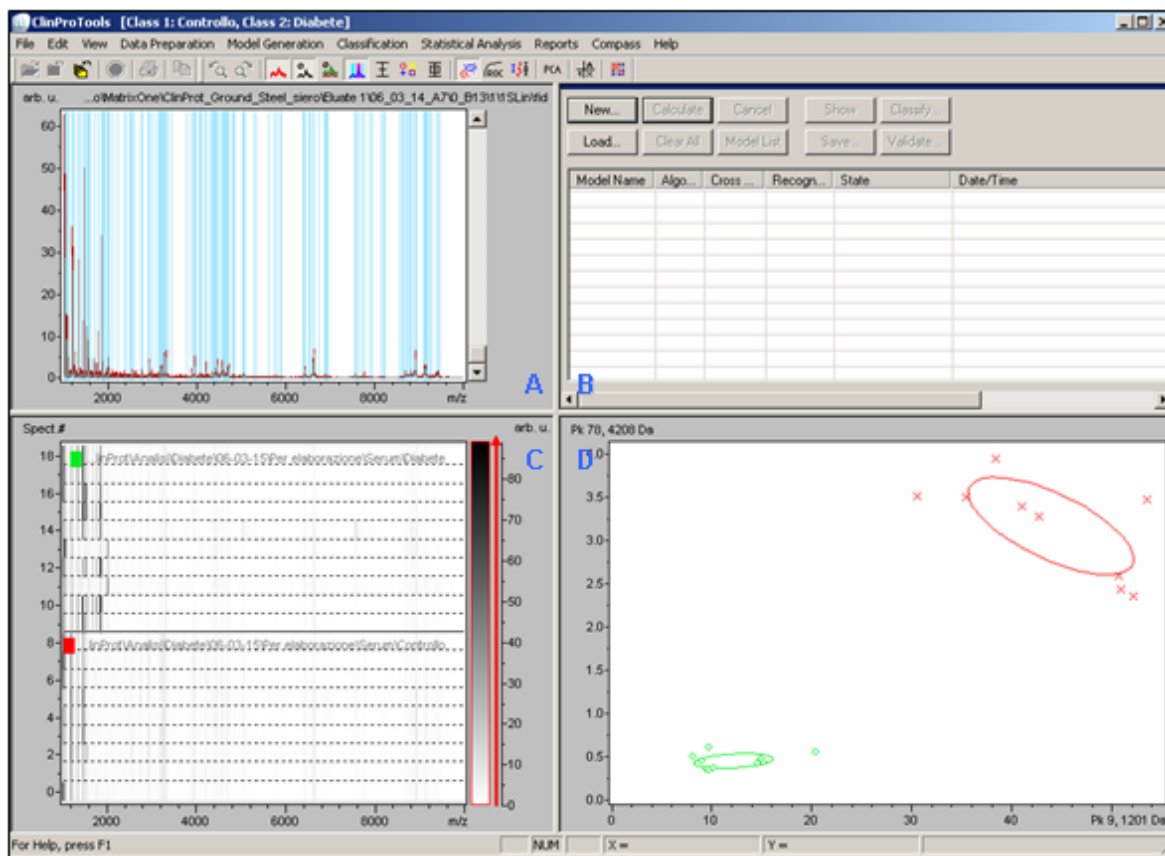
Il programma opera una normalizzazione sulla corrente ionica totale (TIC) di tutti gli spettri in elaborazione, passaggio fondamentale per una corretta elaborazione dei dati, e una nuova calibrazione in base ai picchi di maggiore intensità. A questo punto il software permette di effettuare alcune operazioni sugli spettri per ottimizzare il numero e l'accuratezza dei segnali. Per ogni picco viene poi calcolata l'area, che è correlata all'abbondanza relativa della sostanza nei diversi campioni di studio.

A fini di eseguire una corretta analisi statistica, il software fornisce anche due importanti funzioni "Support Spectra Grouping" ed "Enable Similarity Selection", che consentono di calcolare lo spettro medio di ogni campione e selezionare lo spettro il

cui profilo è più simile alla media complessiva; dunque, solo uno spettro degli otto acquisiti per ogni campione mediante analisi MALDI-TOF viene utilizzato nell'elaborazione.

L'indagine di possibili pattern proteici in grado di discriminare le popolazioni in esame è condotta tramite utilizzo di algoritmi matematici utili per la creazione di un modello diagnostico.

La Figura 28 mostra la schermata principale del software ClinProTools™.



**Figura 28.** Schermata principale del software ClinProTools™ (Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

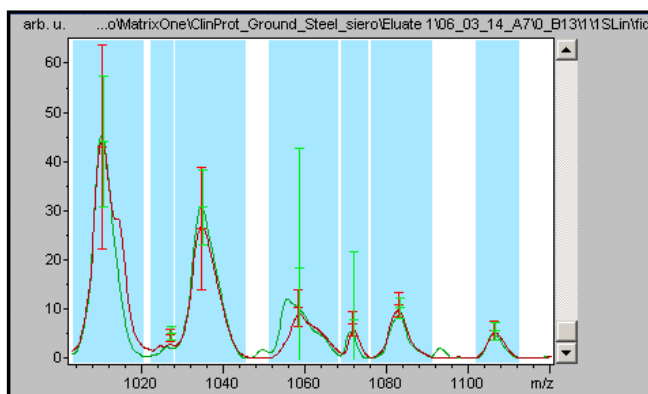
Tutti i singoli spettri di una determinata classe sono visualizzati con lo stesso colore. Solitamente gli spettri della prima classe caricata sono mostrati in rosso, gli spettri della seconda classe in verde, gli spettri della terza in blu, e così via. Possono comunque essere caricate un massimo di otto classi, utilizzando la colorazione automatica fornita dal software.

In questa singola schermata, il software visualizza in quattro finestre le principali informazioni relative ai profili spettrali studiati:

- A. Spectra View**, che mostra uno spettro medio o singolo di tutti i profili spettrali relativi a due o più classi distinte. L'asse x riporta i valori di  $m/z$ , mentre l'asse y i



valori di intensità dei picchi secondo unità arbitrarie. Tutti i singoli spettri di una classe presentano lo stesso colore che è indicato anche nella Gel View. Qualora si voglia visualizzare un altro spettro della stessa o di un'altra classe, è possibile selezionarlo sulla Gel View o utilizzare la barra di scorrimento. Dopo la ricalibrazione degli spettri caricati nel software, la finestra mostra sempre lo spettro medio totale in colorazione grigia. In aggiunta, è possibile visualizzare lo spettro medio della classe in una colorazione più scura rispetto ai corrispondenti spettri singoli. Inoltre, selezionando "peak calculation" si ha un calcolo dell'area dei picchi di ogni spettro, i quali vengono evidenziati in bande verticali blu. Nel caso in cui si abbia, invece, un modello di classificazione ottenuto con gli algoritmi forniti dal software, i picchi inclusi nel modello sono marcati in bande rosse. In ogni caso, la finestra Spectra View permette di includere ed escludere manualmente gli spettri non processati dal software o determinati picchi, nonché forzare i picchi più significativi statisticamente evidenziandoli con bande verticali verdi al fine di utilizzarli nella costruzione di un modello di classificazione. Infine, è possibile visualizzare in questa finestra anche alcune informazioni statistiche relative a tutti i picchi in esame o ad un numero ristretto di essi (es. media e deviazione standard, distribuzione dei picchi, "box and whiskers") (Figura 29).



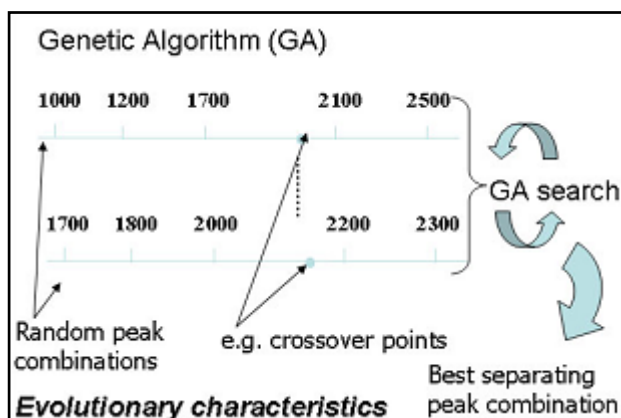
**Figura 29.** Spectra View in cui sono evidenziate la media e la deviazione standard dei picchi degli spettri medi di due classi in esame (Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

**B. Model List View**, nella quale è possibile scegliere e impostare diversi algoritmi matematici (Genetic Algorithm, Support Vector Machine, QuickClassifier e Supervised Neural Network) al fine di creare modelli di classificazione per le popolazioni in esame. Per ogni modello sono riportati il nome, il tipo di algoritmo utilizzato, i valori di "Cross Validation" (indice predittivo di bontà del modello per future classificazioni) e "Recognition Capability" (capacità del cluster di

classificare correttamente i campioni con cui è stato elaborato). Dopo aver impostato i parametri di un modello, è necessario selezionare il comando "Calculate" per dare avvio alla creazione, la cui progressione è mostrata come "% Generative Model" e "% X Val. Calc.". Nel caso in cui il valore di "Cross Validation" non può essere calcolato a causa dello scarso numero di spettri (< 20), compare l'avviso "Insufficient Spectra Number". Quando si seleziona un modello, precedentemente calcolato, nella Spectra View vengono evidenziati i picchi che compongono il pattern diagnostico.

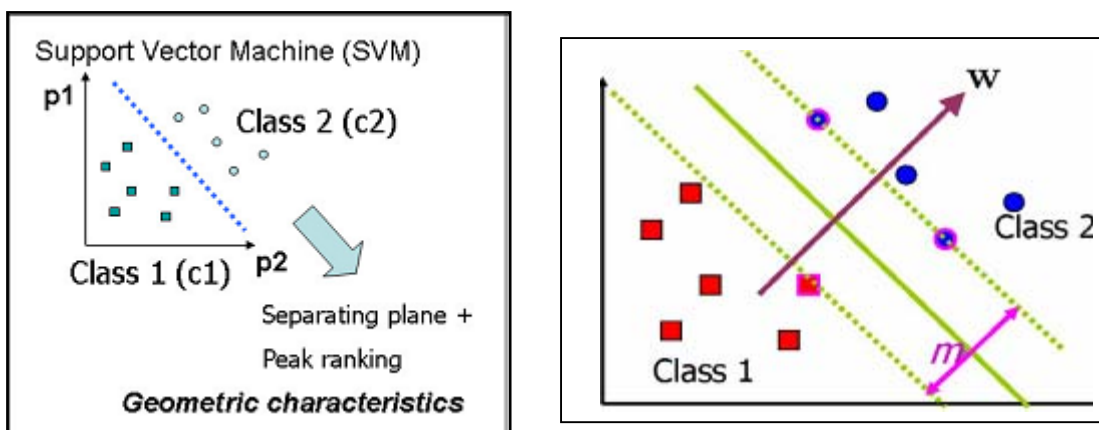
Genetic Algorithm (GA) (Figura 30) è utilizzato per selezionare le migliori combinazioni di picchi statisticamente significativi in grado di separare le popolazioni in esame. Questo algoritmo si ispira al principio della selezione naturale di Charles Darwin che regola l'evoluzione biologica, per cui in un processo evolutivo vi è una selezione naturale che predilige la specie più idonea. L'algoritmo genetico usa i meccanismi base che guidano lo sviluppo; il crossover cromosomico e le mutazioni aumentano le diversità nella specie e sono seguiti dalla sopravvivenza dell'individuo più idoneo. Nella procedura genetica del software, il modello (combinazione di picchi) è considerato come "cromosoma logico", mentre i picchi come "geni". L'algoritmo genetico è sviluppato da una popolazione iniziale di modelli fondati su un numero variabile di picchi. Vengono quindi selezionati i modelli più idonei, mentre quelli meno predittivi vengono scartati. L'idoneità è definita dal gruppo di tecniche e dai calcoli per la selezione. I modelli selezionati sono poi sottoposti a ricombinazione (*crossing over*), dove coppie di modelli vengono scomposte, modificate e poi riunite. Tutto questo può essere seguito da una mutazione, dove un singolo picco del modello viene sostituito con un altro. Con i modelli più idonei (migliori dei loro progenitori) viene eseguita nuovamente la ricombinazione in modo da ottenere una nuova generazione e il processo si ripete fino a raggiungere il modello migliore. In ogni modello che si desidera creare mediante algoritmo genetico, è possibile selezionare il numero massimo di picchi utilizzati per la costruzione, il numero massimo di generazioni e il numero di spettri nelle vicinanze che il modello deve considerare per la classificazione dei profili di interesse. Inoltre, altri due parametri importanti per la definizione del modello migliore sono il valore di "Mutation Rate", che indica la probabilità che si verifichi una mutazione, e il valore di "Crossover Rate", che è la probabilità che si verifichi crossing over. Il risultato finale di un modello di questo tipo è rappresentato dalla combinazione di picchi

che separa nel miglior modo possibile le popolazioni in esame.



**Figura 30.** Meccanismo utilizzato dall' Algoritmo Genetico (GA) (Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

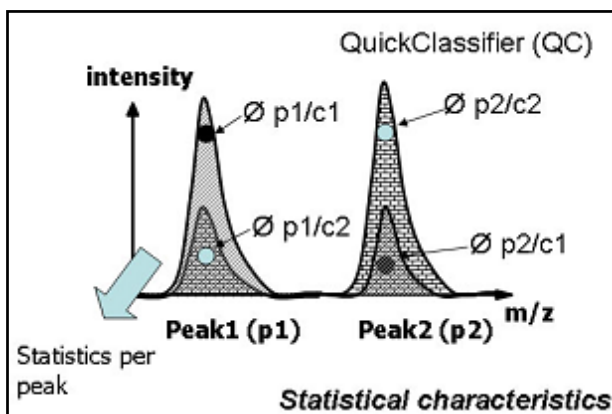
Support Vector Machine (SVM) (Figura 31) seleziona, invece, una combinazione di picchi che permettano di separare le popolazioni in esame attraverso l'utilizzo di un vettore. Si basa sul principio di "minimizzazione del rischio strutturale (SRM)", ovvero ha lo scopo di identificare la combinazione migliore e con il minor rischio di fallimento. Anche in questo modello è possibile selezionare il numero massimo di picchi utilizzati per la costruzione e il numero di spettri nelle vicinanze che il modello deve considerare per la classificazione dei profili di interesse.



**Figura 31.** Meccanismo di funzionamento dell'algoritmo Support Vector Machine (SVM) (Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

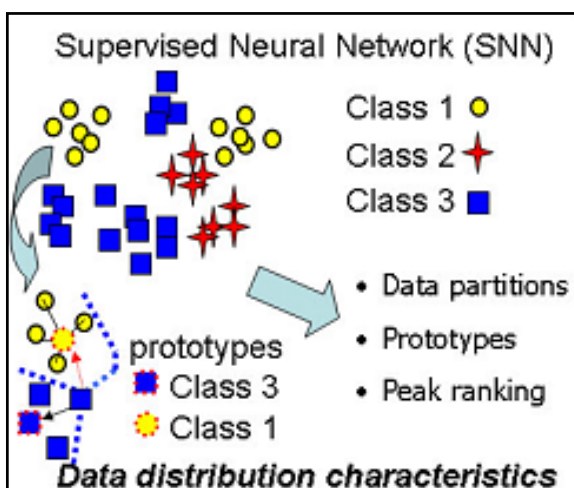
QuickClassifier (QC) (Figura 32) seleziona tutte le aree/intensità dei picchi con relativi valori di p-value e calcola la media pesata di questi. Opera, quindi, un confronto dei valori delle medie pesate ed indica sia l'insieme di picchi in grado di fornire una migliore separazione sia la probabilità di corretta classificazione per

ogni popolazione in esame. La classe con il più alto indice di probabilità rappresenta la classe predittiva.



**Figura 32.** Principio di funzionamento dell'algoritmo QuickClassifier (QC) (Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

Supervised Neural Network (SNN) (Figura 33) seleziona gli spettri che sono identificativi di ogni classe in esame e che sono quindi in grado di fornire una buona separazione. Tutti questi spettri sono chiamati prototipi.



**Figura 33.** Principio di funzionamento dell'algoritmo Supervised Neural Network (SNN) (Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

Ogni modello può essere validato mediante una *cross validation*, in cui è possibile far classificare al modello, durante la sua elaborazione, gli stessi spettri che sono stati utilizzati per crearlo oppure eseguire una *external validation* di nuovi campioni non impiegati nella costruzione del modello classificativo; questa metodica è utile per valutare la specificità, la sensibilità e le percentuali di classificazioni positive o negative.

Nella *cross validation* uno o più spettri vengono presi dall'insieme dei dati di prova e utilizzati nel rispettivo modello, mentre i restanti sottoinsiemi di spettri considerati nel clustering.

In accordo con il cluster risultante definito, gli insiemi di dati che sono stati esclusi

vengono classificati. Il risultato (classificazione vera o falsa nelle rispettive classi di appartenenza) valida la valenza diagnostica di un modello.

Per la validazione di un modello, l'insieme dei dati di prova rappresenta le classi che possono essere scelte. La validazione determina le dimensioni della classe, la specificità e la sensibilità del modello ottenuto con l'insieme di dati prova e determina la capacità di previsione del modello in base alla percentuale dei dati di prova correttamente classificati.

In conclusione, campioni sconosciuti possono essere classificati utilizzando il modello di analisi, ottenendo una previsione della classe di appartenenza.

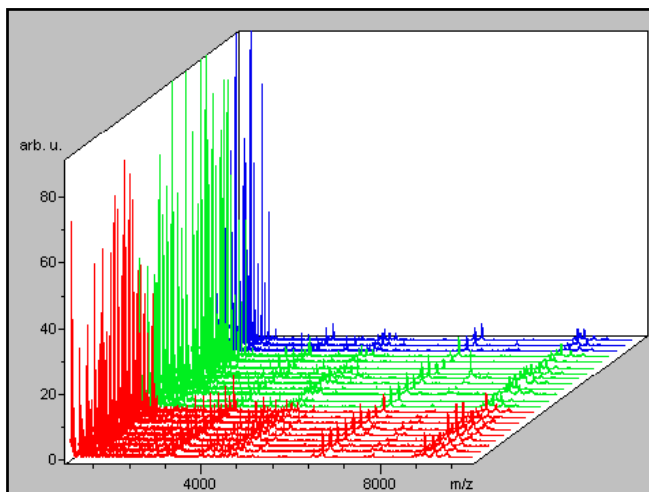
Questa operazione può essere effettuata con un modello già presente o direttamente su un modello precedentemente creato. L'insieme delle variabili e dei parametri può essere modificato a piacere secondo le necessità dello studio. In una fase avanzata delle analisi, variare i parametri permette un'ottimizzazione del lavoro.

**C.** *Gel/Stack View*, che rappresenta un'immagine virtuale di gel (pseudo-gel) in cui sono mostrati tutti i segnali dei campioni che costituiscono le due classi in analisi. La *Gel/Stack View* è costituita da due finestre, *Gel View* e *Stack View*, che possono essere facilmente visualizzate e interscambiate; in ogni caso, la finestra *Gel View* viene mostrata sempre all'apertura del software.

La finestra *Gel View* visualizza tutti gli spettri delle classi caricate sottoforma di gel virtuale e nell'asse x sono riportati i valori di  $m/z$ , mentre sull'asse y a sinistra il numero degli spettri in successione. L'intensità dei picchi è, invece, espressa mediante una scala lineare di colore grigio, che è riportata a destra della finestra con il relativo asse di valori in unità arbitrarie. Questa finestra mostra i picchi degli spettri sottoforma di spots di diversa densità; sono comunque disponibili diverse scale di colorazione per rilevare anche le minime differenze di intensità. Ogni classe di campioni è separata dalla successiva mediante una linea orizzontale. Come per la *Spectra View*, anche in questa finestra è possibile escludere o includere manualmente gli spettri non processati; in particolare, gli spettri esclusi possono essere non visualizzati più nel pseudo-gel.

La finestra *Stack View* (Figura 34), invece, mostra tutti gli spettri delle classi in un'immagine 3D. L'asse x riporta i valori di  $m/z$ , l'asse y le intensità dei picchi in unità arbitrarie e l'asse z l'ordine di caricamento delle classi. Gli spettri della prima classe caricata sono in primo piano, mentre le altre classi sono a seguire in secondo piano. L'orientamento del grafico è di  $30^\circ$ , ma può essere cambiato

liberamente. Anche qui gli spettri sono colorati a seconda della classe di appartenenza e possono essere esclusi o inclusi manualmente.



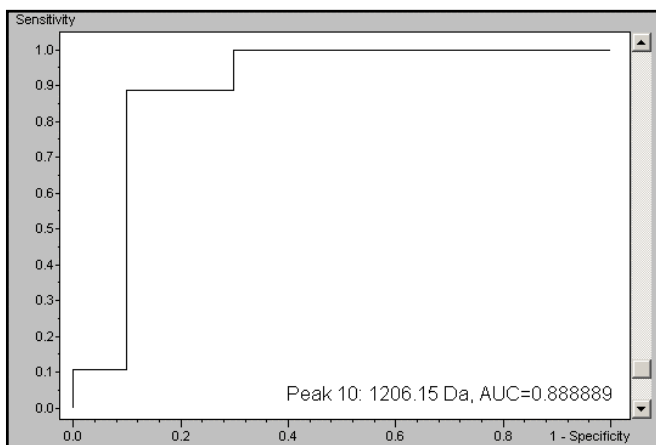
**Figura 34.** Stack View di tre classi in esame (Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

**D. Peak Statistics View**, che consiste di tre finestre, 2D Peak Distribution View, ROC Curve View e Single Peak Variance View. Tutte queste finestre possono essere facilmente visualizzate e interscambiate dopo aver eseguito la *peak calculation*, anche se la 2D Peak Distribution View è mostrata sempre all'apertura del software. In particolare, la finestra ROC Curve View può essere attivata solo nel caso in cui vengano caricate due classi.

La finestra 2D Peak Distribution View mostra la distribuzione dei primi due picchi statisticamente significativi, rilevati dal software, in tutti gli spettri delle classi in esame. Il numero e il valore  $m/z$  di questi picchi è indicato sugli assi x e y. Solitamente l'asse x riporta i valori di area/intensità del primo picco, che presenta infatti minore p-value, mentre l'asse y i valori di area/intensità del secondo picco. È comunque possibile sostituire questi due picchi scelti automaticamente dal software con altri segnali a piacere e valutarne la distribuzione. Tutti i segnali appartenenti alla stessa classe sono indicati con lo stesso simbolo e colore (es. croce rossa per la prima classe, rombo verde per la seconda classe). Le ellissi rappresentano la deviazione standard delle aree/intensità dei picchi o l'intervallo di confidenza del 95%.

La finestra *ROC Curve View* mostra la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic curve*) relativa ad un determinato picco precedentemente selezionato. La curva ROC (Figura 35) offre una visione grafica circa la specificità e sensibilità di un test e, nel caso di questo software, fornisce una stima della capacità discriminante del picco. L'asse x riporta la specificità in termini di falsi

positivi, mentre l'asse y la sensibilità; in entrambi gli assi i valori rientrano in un range da 0 a 1. Prima di configurare una curva ROC, il software chiede di impostare la classe che deve essere considerata come riferimento positivo; logicamente, questa funzione è possibile solo nel caso di due classi in esame. Il numero e il valore di  $m/z$  del picco di interesse, su cui è stata costruita la curva, sono riportati in basso a destra del grafico; queste indicazioni sono seguite dal valore AUC, che rappresenta l'area sotto la curva, cioè la capacità del picco di classificare correttamente i soggetti controllo e i pazienti. Un valore AUC uguale a 0 indica una capacità discriminante del picco nulla, mentre un valore AUC uguale a 1 un'ottima capacità discriminante (Figura 35) <sup>234</sup>. È possibile, infine, visualizzare con la barra di scorrimento le curve ROC di tutti i segnali degli spettri.

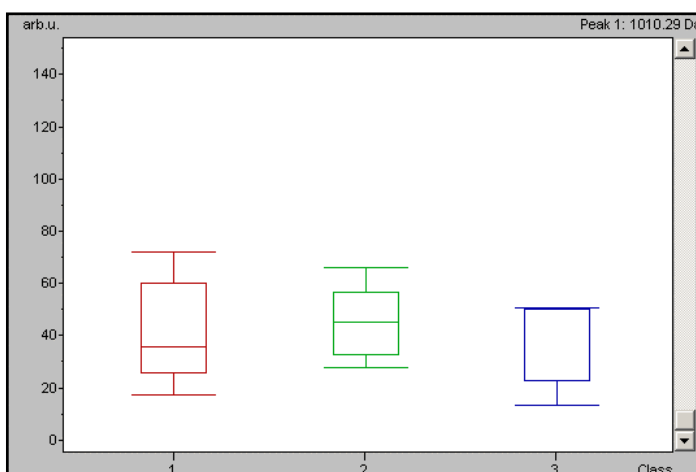


**Figura 35.** Esempio di curva ROC (Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

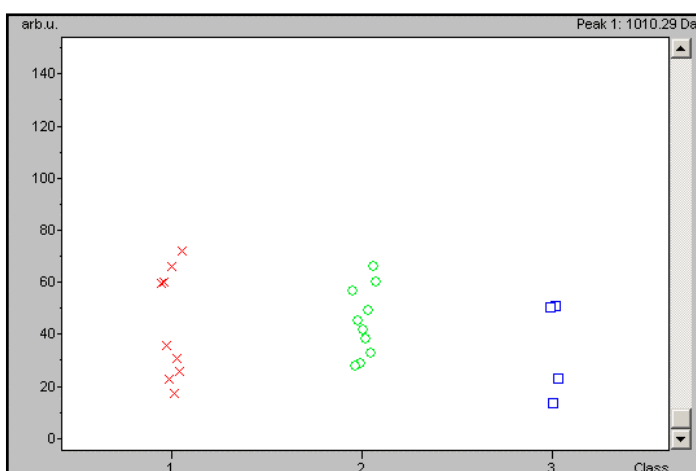
AUC=0.5	non-informative test
0.5<AUC≤0.7	less accurate
0.7<AUC≤0.9	moderately accurate
0.9<AUC<1	highly accurate and
AUC=1	perfect tests

**Figura 36.** Interpretazione dei valori AUC ottenuti dall'analisi della curva ROC per la misura dell'accuratezza di un modello diagnostico <sup>234</sup>.

La finestra *Single Peak Variance View* mostra tre tipologie di dati statistici relativi ad un determinato picco precedentemente selezionato: media e deviazione standard, distribuzione del picco e “box and whiskers” (Figure 37-38-39). Tutte queste informazioni sono ottenute dai valori di area/intensità del picco selezionato e sono riportate separatamente per ogni classe in studio. Il numero e il valore  $m/z$  del picco di interesse sono indicati in alto a destra del grafico. È possibile visualizzare solo un grafico statistico per volta, ma è possibile interscambiarli facilmente; qualora fossero selezionati i comandi di tutte e tre le finestre, esiste un ordine di importanza nella visualizzazione dei grafici: “box and whiskers”, distribuzione del picco ed, infine, media e deviazione standard. È possibile, infine, mostrare con la barra di scorrimento i dati statistici di tutti i segnali degli spettri oppure evidenziare il picco di interesse e selezionare la voce “Variance for Peak n”.

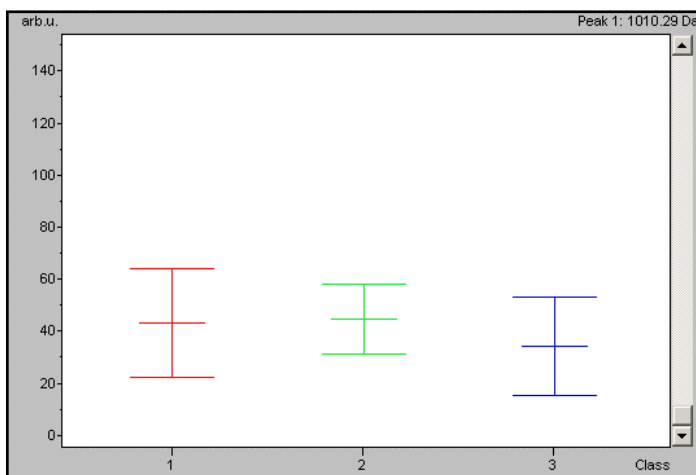


**Figura 37.** Single Peak Variance View visualizzata nella modalità “box and whiskers” (Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).



**Figura 38.** Single Peak Variance View visualizzata nella modalità distribuzione del picco (Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).





**Figura 39.** Single Peak Variance View visualizzata nella modalità media e deviazione standard (Immagine utilizzata su gentile concessione di Bruker Daltonik GmbH).

Insieme alla possibilità di creare modelli di classificazione mediante algoritmi genetici, il software fornisce due ulteriori approcci per eseguire un'indagine statistica al fine di rilevare le differenze di espressione tra le classi in esame: *Peak Statistic Report* e *Correlation Matrix Report*.

Selezionando la voce "Peak Statistic" nel menu Report è possibile creare e visualizzare un *Peak Statistic Report*, cioè un elenco di tutti i picchi rilevati dal software durante la *Peak Statistic Calculation* (ricalibrazione degli spettri, calcolo degli spettri medi e calcolo dei picchi) nell'ordine dal più discriminante a quello meno differente a livello di espressione. Sulla base di un t-test/Anova per insiemi di dati parametrici ed un Wilcoxon/Kruskal-Wallis per test non parametrici, viene calcolato per ogni picco il valore *p-value* (PTTA e PWKW) indicativo della probabilità che la differenza di espressione trovata nelle popolazioni in esame non sia fondata su un evento casuale. Dunque questo indice rappresenta il livello di significatività effettiva ed è indipendente dall'altezza e dall'area del picco. Se il *p-value* è  $\leq 0,05$  il segnale è statisticamente significativo ai fini di una buona separazione, mentre se il *p-value* è  $> 0,05$  il segnale non permette una discriminazione delle classi. Il valore *PAD* rappresenta il valore *p-value* ottenuto da un test Anderson-Darling ed indica se il segnale è parametrico ( $PAD > 0,05$ ) o non parametrico ( $PAD \leq 0,05$ ) e quindi suggerisce se è necessario rifarsi al PTTA o al PWKW. Nella tabella sono riportati anche il numero del picco, il valore di massa, la media delle aree di ogni classe e la differenza tra queste (DAve) ed, infine, le deviazioni standard di ogni classe in esame (StdDev).

Confrontando ogni picco in base al relativo potere di separazione, questo strumento statistico fornisce quindi tutte le differenze fra le classi analizzate.

Il *Correlation Matrix Report*, invece, è una matrice ottenuta mediante analisi di

correlazione tra tutti i picchi identificati dal software e riportati nel *Peak Statistic Report*. Questa analisi può essere eseguita su più classi a confronto oppure su una singola classe. Logicamente, questa funzione deve essere preceduta dalla ricalibrazione degli spettri e dal calcolo dei picchi. Ogni riquadro della matrice presenta un determinato colore a seconda del tipo di correlazione tra i segnali dell'incrocio: rosso se è presente correlazione positiva, blu per una correlazione negativa e grigio quando non vi è correlazione. Quando il valore di correlazione si avvicina a +1, significa che è presente correlazione positiva e quindi ad un aumento di intensità del picco corrisponde un aumento del segnale correlato all'interno della stessa classe in esame. Quando, invece, il valore si avvicina a -1, significa che è presente correlazione negativa e quindi ad un aumento di intensità del picco corrisponde una riduzione del segnale correlato all'interno della stessa classe in esame. Infine, quando il valore si avvicina a  $\pm 0$ , non è presente correlazione tra i due segnali.

I parametri utilizzati dal software per le analisi sono stati ottimizzati in base alla tipologia di campione studiato.

### *Urine*

Gli spettri sono stati ricalibrati in base ai picchi di maggiore intensità. Una sottrazione della linea di base è stata applicata agli spettri mediante algoritmo "Top Hat" con 15% di ampiezza minima del picco calcolata alla base. Gli spettri sono stati processati in un range di  $m/z$  1-10 kDa e non sono stati sottoposti a smoothing. La risoluzione è stata impostata a 800. È stata attivata la funzione "Spectra Grouping" ("Support Spectra Grouping" ed "Enable Similarity Selection") in modo da calcolare lo spettro medio di ciascun campione e selezionare lo spettro il cui profilo è più simile alla media complessiva. I picchi sono stati rilevati fissando un rapporto S/N uguale a 3 e l'area dei picchi è stata calcolata utilizzando un tipo di integrazione *end-point level*.

### *Siero*

Tutti gli spettri sono stati innanzitutto ricalibrati e una correzione della linea di base è stata applicata mediante algoritmo "Top Hat" con 10% di ampiezza minima del picco calcolata alla base. Inoltre gli spettri sono stati sottoposti a smoothing e processati in un range di  $m/z$  1-10 kDa. La risoluzione è stata impostata a 800. È stata attivata la funzione "Spectra Grouping" ("Support Spectra Grouping" ed "Enable Similarity

Selection”). I picchi sono stati rilevati fissando un rapporto S/N uguale a 7 e l’area dei picchi è stata calcolata utilizzando un tipo di integrazione *end-point level*.

## Software RAPID MINER

### *Urine*

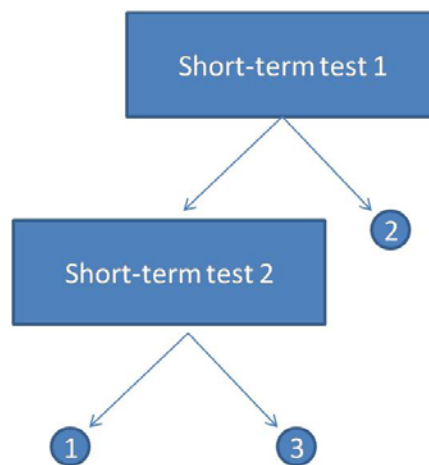
L’analisi statistica dei profili proteici ottenuti dopo purificazioni dei campioni con biglie a debole scambio cationico (WCX) è stata eseguita con l’aiuto del Dipartimento di Informatica Sistemistica e Comunicazione dell’Università Milano-Bicocca (Dr. Italo Zoppis, Prof. Giancarlo Mauri).

Il cluster di segnali ritenuti più opportuni per la discriminazione diagnostica delle popolazioni in esame è stato scelto applicando un approccio (noto con il nome di *wrapper*), che generalmente viene utilizzato nel contesto della *feature selection*. In questo caso ci si avvantaggia della capacità inferenziale di un algoritmo predittivo (ad esempio, una *support vector machine*) per valutare l’insieme di feature (il cluster di peptidi) che costituisce l’input stesso per il metodo. Questa metodologia è stata applicata considerando inizialmente un cluster di segnali vuoto e successivamente inserendo di volta in volta nuovi segnali nel caso in cui venisse osservato un incremento nella misura di performance adottata. La procedura descritta è stata implementata utilizzando l’ambiente SW Rapid Miner. Questo strumento consente di progettare un esperimento finalizzato all’analisi di dati e all’inferenza di nuove informazioni o in un contesto più generale, al cosiddetto problema del *knowledge discovery* (KD). In modo particolare, un processo in Rapid Miner può essere descritto per mezzo di una struttura rappresentata da un grafo di operatori. Ciascun operatore realizza un particolare compito di KD; per esempio, sono presenti operatori di *pre-processing* dei dati, di valutazione delle performance oppure operatori che realizzano algoritmi di apprendimento.

In Figura 40 viene rappresentato il processo (*short-term test*) per selezionare e valutare il cluster di segnali scelti. Questo processo, infatti, può essere utilizzato per differenti problematiche di classificazione binaria o più in generale con altri processi simili estendendo il problema della classificazione a più classi o gruppi di appartenenza. In tal caso, la classificazione tra più gruppi può essere facilmente ottenuta adottando una strategia di scelte sequenziali. La struttura decisionale, per rappresentare classificazioni di questo tipo, è generalmente chiamata “albero decisionale”.

Nello specifico, utilizzando il processo in Figura 40 per lo studio del tumore renale, è stato possibile selezionare un primo insieme di segnali e allo stesso tempo addestrare una SVM (M1) che valutasse la bontà di questo insieme discriminando il gruppo 1,3 (controlli e pazienti non-ccRCC) dal rimanente gruppo 2 (pazienti ccRCC). Infine, utilizzando lo stesso schema è stato possibile addestrare una seconda SVM (M2) e selezionare un secondo insieme di segnali utili per discriminare il gruppo di controlli dai pazienti non-ccRCC. La classificazione tra le tre classi è stata quindi ottenuta combinando in sequenza le due SVM, M1 e M2: il processo completo ha trovato il suo compimento nella seconda fase di discriminazione.

In questa analisi la distribuzione (iniziale) di probabilità sulla popolazione (in riferimento cioè al gruppo di appartenenza) è stata stimata su base campionaria. Tale distribuzione è stata calcolata nella seguente misura:  $\pi_1 = 0.46$ ,  $\pi_2 = 0.43$  and  $\pi_3 = 0.11$ . Nel calcolare questa probabilità si è fatta l'assunzione di indipendenza condizionata dalla vera classe di appartenenza del soggetto; in altri termini, il risultato di uno short-term test T1 non può influenzare il risultato di uno short-term test T2, fissata la classe di appartenenza dell'individuo.



**Figura 40.** Processo decisionale impiegato sui dati ottenuti da purificazione con biglie magnetiche WCX delle urine di controlli (classe 1), pazienti ccRCC (classe 2) e pazienti non-ccRCC (classe 3).

### Software MedCalc®

Il software MedCalc consente un'analisi statistica specializzata per la ricerca biomedica. In questo lavoro di ricerca, tale programma è stato impiegato per l'analisi delle curve ROC (*receiving operating characteristic curve*) dei segnali inclusi nei modelli diagnostici e per la valutazione della espressione durante la progressione della patologia tumorale. Al fine di eseguire queste operazioni è stata esportata dal software ClinProTools™ una *peak list*, ossia una lista in cui per ciascuno dei soggetti

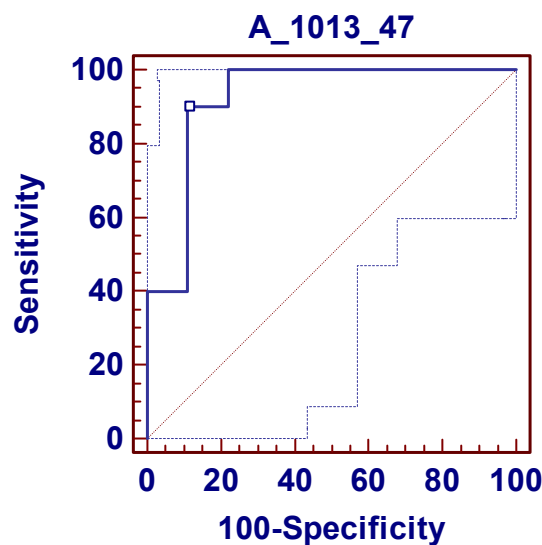
in studio sono riportati i valori delle aree/intensità dei picchi, precedentemente rilevati dal software sullo spettro medio totale calcolato.

L'analisi della curva ROC consente di valutare l'accuratezza di un particolare test diagnostico, ossia la sua capacità di distinguere i casi malati dai soggetti sani. La curva ROC offre una visione grafica circa la specificità e sensibilità di un test e fornisce una stima della abilità discriminante di un determinato picco. Prima di configurare una curva ROC, il software chiede di inserire la variabile di interesse (in questo caso, i valori di intensità/area del picco selezionato) e la variabile di classificazione (generalmente è la classe di appartenenza dei soggetti in studio sulla base della loro diagnosi clinica). In Figura 41 è riportata la schermata di risultato fornita dal software con relativo grafico della curva ROC del picco. Nel report viene fornito il valore AUC (*area under the curve*), che rappresenta la capacità discriminante del picco, ossia la sua attitudine a separare propriamente la popolazione in studio in soggetti malati e sani. Quando la variabile in studio (picco selezionato) non è in grado di distinguere le due classi, l'AUC sarà uguale a 0,5 (curva ROC coinciderà con la diagonale); quando invece si ha una perfetta separazione dei dati, ossia non vi è una sovrapposizione delle due distribuzioni, l'AUC equivale a 1 (curva ROC raggiungerà l'angolo in alto a sinistra del *plot*). Inoltre, viene riportato il *p-value* indicativo della probabilità che la differenza di espressione nelle popolazioni in esame non sia fondata su un evento casuale. È presente anche una lista con i diversi indici di *cut-off* (valori soglia) e le relative percentuali di sensibilità e specificità del test; il *cut-off* contrassegnato con un asterisco rappresenta l'indice corrispondente al maggior grado di accuratezza (minor numero di falsi negativi e falsi positivi). Il grafico della curva ROC riporta sull'asse x la specificità in termini di falsi positivi (100-specificità), mentre l'asse y la sensibilità per i diversi punti di *cut-off*. L'unione dei punti ottenuti riportando nel piano cartesiano ciascuna coppia (sensibilità) e (1-specificità) genera una curva spezzata con andamento a scaletta (*ROC plot*).

Variable	A_1013_47
Classification variable	Class
Positive group	
Class	= 1
Sample size	10
Negative group	
Class	= 0
Sample size	9
Disease prevalence (%)	unknown
Area under the ROC curve (AUC)	0.922
Standard error	0.0685
95% Confidence interval	0.704 to 0.990
z statistic	6.160
Significance level P (Area=0.5)	0.0001

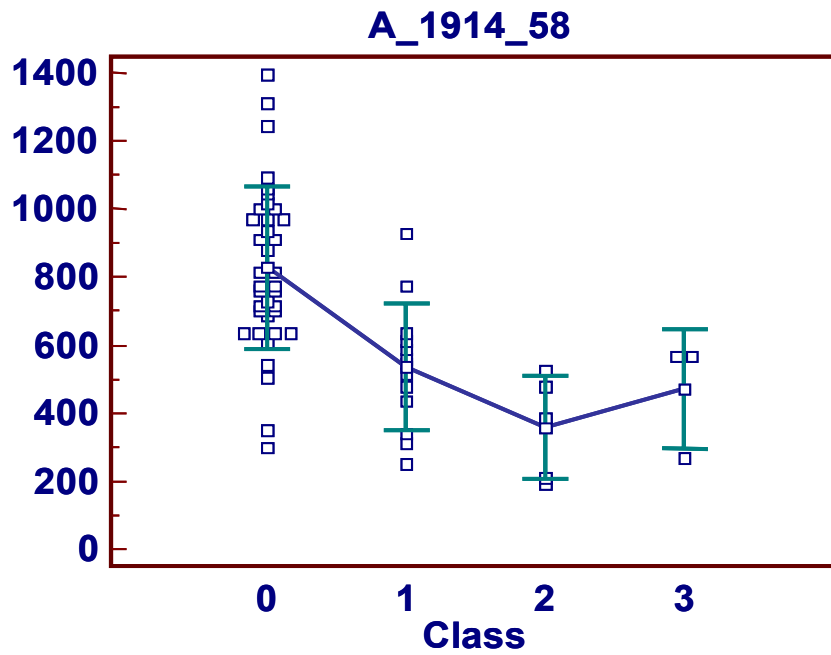
**Criterion values and coordinates of the ROC curve**

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
< 27.6617	0.00	0.0 - 31.0	100.00	66.2 - 100.0		1.00
<= 61.1944	40.00	12.4 - 73.6	100.00	66.2 - 100.0		0.60
<= 66.7015	40.00	12.4 - 73.6	88.89	51.7 - 98.2	3.60	0.68
<= 80.3016 *	90.00	55.5 - 98.3	88.89	51.7 - 98.2	8.10	0.11
<= 83.9557	90.00	55.5 - 98.3	77.78	40.1 - 96.5	4.05	0.13
<= 89.0745	100.00	69.0 - 100.0	77.78	40.1 - 96.5	4.50	0.00
<= 136.272	100.00	69.0 - 100.0	0.00	0.0 - 33.8	1.00	

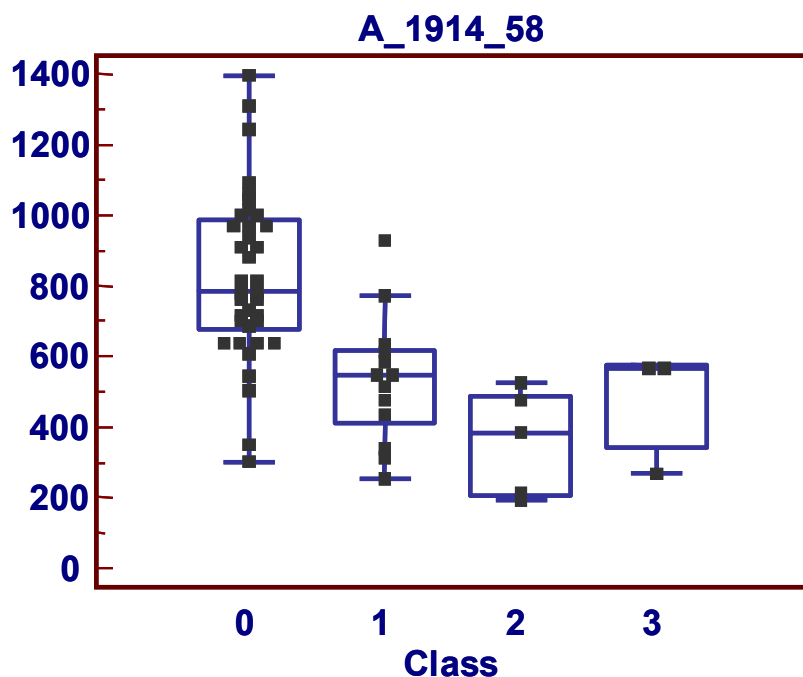


**Figura 41.** Esempio di analisi della curva ROC ottenuta con il software MedCalc®

La funzione *Multiple Comparison Graphs* (figura 42-43) permette di visualizzare l'influenza di un fattore qualitativo (discreto) su una determinata variabile continua (in questo caso, valutazione dell'espressione del picco sulla base del stadio tumorale). Il grafico può essere visualizzato in diverse modalità.



**Figura 42.** Esempio di *Multiple Comparison Graphs* eseguita con il software MedCalc®. Sull'asse x sono riportate le classi in studio (fattore qualitativo), mentre sull'asse y la variabile continua. Rappresentazione di tutti i data points in esame, *error bars* indicative di un intervallo di confidenza del 95%, e linea che connette i valori medi di ciascuna classe.



**Figura 43.** Esempio di *Multiple Comparison Graphs* eseguita con il software MedCalc®. Sull'asse x sono riportate le classi in studio (fattore qualitativo), mentre sull'asse y la variabile continua. Rappresentazione "box and whisker" di tutti i data points in esame.

### 3.5 IDENTIFICAZIONE DI BIOMARCATORI

#### **MATERIALI:**

- Acido trifluoroacetico (TFA), CF<sub>3</sub>COOH (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland).
- Acetonitrile, CH<sub>3</sub>CN (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).
- Acido formico, HCOOH (Carlo Erba, Milano, Italy).

#### **STRUMENTI:**

- HPLC Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA).
- Spettrometro di Massa ESI-IT Esquire 3000 Plus™ (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany).
- Vortex (Apparecchi Scientifici E. Pasquali, Milano, Italy).
- Centrifuga Mini Spin (Eppendorf, Hamburg, Germany).
- Centrifuga da vuoto HETOVAC VR-I (Heto Lab. Equipment, Allerød, Denmark).

#### **SOFTWARE:**

- Esquire control™ 5.3 per la gestione dello Spettrometro di Massa ESI-IT (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany).
- DataAnalysis™ 4.0 per l'elaborazione dei dati ottenuti dall'analisi.
- BioTools™ 3.0 per effettuare la ricerca in banca dati (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany).
- Chromeleon™ 6.8 per il controllo dell'HPLC (Dionex, Sunnyvale, CA, USA).

#### **SERVER:**

- MASCOT Intranet™ (Matrix Science, Londra, UK) ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

#### **METODI:**

Al fine di identificare i segnali differentemente espressi nelle classi in esame e che quindi costituiscono potenziali biomarcatori, è stata eseguita un'analisi mediante nanoHPLC ESI-MS/MS. Con questa tecnica è quindi possibile ottenere la frammentazione dei peptidi di interesse, presenti nelle frazioni di eluizione raccolte dopo purificazione dei campioni e non utilizzate per gli studi di profiling al MALDI-TOF. Infatti, gli eluati di ciascuna popolazione in esame (controlli e pazienti) sono stati riuniti, portati a secco e ripresi in 25 µl di TFA 0,1%/CH<sub>3</sub>CN 2%/H<sub>2</sub>O; quindi



iniettati in HPLC-ESI-IT.

Le analisi in HPLC-ESI sono state eseguite con le seguenti condizioni operative:

- Colonna RP: Zorbax 300 SB C18 75  $\mu\text{m}$  i.d. x 15 cm (Agilent Technologies)
- Colonna di pre-concentrazione:  $\mu$ -Precolumn™ Cartridge PepMap 100A 300  $\mu\text{m}$  i.d. x 5 mm (Dionex)
- Flusso di caricamento del campione: 20  $\mu\text{l}/\text{min}$
- Flusso di eluizione: 300  $\text{nl}/\text{min}$
- Quantità di campione iniettata nella colonna: 20  $\mu\text{l}$
- Fase mobile di caricamento del campione: soluzione di TFA in  $\text{H}_2\text{O}$  al 0,1% e  $\text{CH}_3\text{CN}$  al 2%
- Fase mobile A:  $\text{H}_2\text{O}$  con 0,1% di acido formico
- Fase mobile B: soluzione di  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  20/80 con 0,1% di acido formico
- Gradiente: da 1,6% a 56% di acetonitrile in 25 minuti e da 56% a 78,4% in 5 minuti, dopo 5 minuti di condizionamento
- Gas di collisione: elio
- Modalità di analisi e intervallo di  $m/z$ : modalità d'acquisizione positiva in un intervallo di massa da 300 a 1800 Da.

Lo spettrometro di massa è programmato in modo tale da registrare cicli completi costituiti da una scansione completa (MS), seguita da due scansioni consecutive MS/MS dei due ioni più intensi rilevati nella scansione MS. Gli ioni che sono riconosciuti come precursori in tre spettri MS consecutivi, vengono esclusi dalla scansione MS/MS per i successivi 15 secondi.

Dopo l'acquisizione gli spettri vengono rielaborati e trasformati in file *.MGF*, che viene utilizzato per eseguire le ricerche in banca dati. I cromatogrammi sono processati con il software DataAnalysis™ e i dati ottenuti vengono utilizzati per l'identificazione di proteine con il motore di ricerca Mascot.

#### Software DATAANALYSIS™

Dopo aver eseguito l'analisi in LC-ESI-MS/MS, gli spettri vengono processati con il software DataAnalysis™. DataAnalysis consente di visualizzare i cromatogrammi relativi all'acquisizione in massa, gli spettri MS e MS/MS. Il software fornisce algoritmi specifici per eseguire diverse operazioni, ad esempio analisi di proteine/peptidi, caratterizzazione strutturale e identificazione degli ioni presenti negli spettri di massa.

Un *cromatogramma* è un tracciato in cui sono riportati tutti i segnali (proporzionali alla quantità di analita eluito) rilevati in funzione del tempo (minuti).

Sono possibili diverse modalità di visualizzazione del cromatogramma:

- *Total Ion Current (TIC)*, che rappresenta la corrente ionica totale rilevata nel tempo.
- *Base Peak Chromatogram*, dove è riportata solamente la corrente ionica del picco base, cioè del segnale di maggiore intensità presente in ogni spettro MS.
- *Extracted Ion Chromatogram (EIC)*, che permette di visualizzare il cromatogramma di un singolo ione o di uno specifico intervallo di massa. Tramite questo cromatogramma è possibile andare a ricercare a quale tempo di ritenzione è stato eluito il marker di interesse; visualizzando lo spettro di massa dello ione precursore si valuta se il rapporto  $m/z$  coincide con quello ottenuto all'analisi in reflectron al MALDI-TOF e si procede quindi a elaborarne il relativo spettro MS/MS.

Il software consente, inoltre, di selezionare sul cromatogramma un picco di interesse ad un determinato tempo dell'analisi. Selezionando la visualizzazione "TIC + All" viene riportato, insieme al cromatogramma totale, gli spettri MS rilevati ogni minuto, nei quali sono evidenziati con rombi di colore rosso gli ioni precursori di cui è stata fatta la frammentazione; è quindi possibile anche scorrere gli spettri MS/MS di tali segnali.

Al fine di ottenere una lista delle masse degli ioni precursori (*compounds*) rilevati con i rispettivi spettri MS/MS da utilizzare successivamente per l'analisi in banca dati con Mascot, è necessario innanzitutto impostare l'algoritmo e i parametri ottimali di ricerca.

Nello specifico dello studio sulla nefropatia diabetica, i principali parametri fissati per la creazione della lista dei picchi sono stati:

- Soglia S/N = 3
- Algoritmo = versione 1.0
- Soglia area/intensità relativa (%) = 0,1
- Skim ratio = 0,1
- Ampiezza di smoothing = 1

Quindi, mediante comando "Find | Compounds-AutoMS(n)" è possibile effettuare una rilevazione automatica dei *compounds* in tutti i cromatogrammi acquisiti. Questa funzione ricerca l'analisi entro un intervallo di tempo di ritenzione selezionato, individua i *compounds* presenti in tutti gli spettri (medi) MS e MS/MS e configura una

lista di masse.

La lista così ottenuta, viene esportata come file *.MGF* attraverso la funzione “File | Export | Compounds”. A questo punto, è possibile passare al software bioinformatico *BioTools* (“File | Send Analysis To | BioTools”), da cui poi aprire il motore di ricerca Mascot per eseguire l'identificazione accurata dei frammenti.

Prima di trasferire la lista di *compounds* in *BioTools* è possibile eventualmente eseguire una deconvoluzione della carica degli spettri di massa mediante funzione “Deconvolute | Mass Spectra”. Il processo di deconvoluzione permette di passare dallo spettro di massa sperimentale multicarica ad uno spettro di massa monocarica che fornisce il peso molecolare vero della molecola.

### Server MASCOT

Mascot è un potente motore di ricerca che utilizza i dati provenienti da analisi in spettrometria di massa, mediante confronto con banche dati di sequenze proteiche primarie, per l'identificazione di proteine. Uno dei vantaggi di Mascot è quello di poter integrare al suo interno diversi metodi di ricerca, ognuno adatto ad una determinata esigenza analitica. I metodi principali sono:

- *Peptide Mass Fingerprint (PMF)* in cui i dati inseriti sono i valori di massa di peptidi provenienti dalla digestione, enzimatica o chimica, di una o più proteine.
- *MS/MS Ion Search* in cui i dati inseriti provengono da analisi MS/MS per ottenere informazioni su una o più sequenze aminoacidiche.
- *Sequence Query* in cui ad uno o più peptidi, utilizzati per il PMF, possono essere associate informazioni sulla sequenza, sulla composizione aminoacidica o valori di *m/z* di ioni provenienti da analisi MS/MS.

In particolare, per poter effettuare la ricerca *MS/MS Ion Search* devono essere fornite al programma informazioni supplementari su come è stata condotta l'analisi in spettrometria di massa. Ci sono informazioni obbligatorie che devono essere fornite al programma per poter ottenere un'identificazione corretta, mentre altre informazioni possono eventualmente essere fornite, ma la loro mancanza non inficia il risultato della ricerca. È necessario scegliere la banca dati all'interno della quale effettuare la ricerca (es. *SwissProt*, che rappresenta il database meno ridondante e quindi più accurato) e indicare nel caso di una digestione enzimatica quale tipo di enzima è stato utilizzato (*None*, se non è stato impiegato alcun enzima). Allo stesso modo, inserire se presenti le modificazioni fisse (*None*, se non vi è presenza alcuna) introdotte durante la preparazione del campione, poiché queste alterano i valori di

massa dei peptidi coinvolti che altrimenti non verrebbero riconosciuti durante la ricerca in banca dati. Anche la presenza di modificazioni post-traduzionali (es. *fosforilazioni*, *glicosilazioni*) può essere aggiunta come parametro. Sono da inserire, inoltre, i valori di massa dello ione parent e dei frammenti generati a partire da quest'ultimo durante l'analisi; inserire, inoltre, il tipo di strumento con il quale è stata eseguita l'analisi in spettrometria di massa (es. *ESI-TRAP*), indicare il tipo di frammentazione avvenuta e la carica degli ioni (es. *charge state 2+ o 3+*), infine specificare che le masse sperimentali fanno riferimento al valore di massa monoisotopica dei peptidi.

Una variabile da fornire al programma e molto importante per l'identificazione corretta della proteina è la tolleranza ovvero la misura dello scarto massimo che ci può essere tra i dati sperimentali e quelli teorici; questi ultimi sono ottenuti mediante digestione simulata (digestione *in silico*). La tolleranza può essere espressa in Dalton, in percentuale o in parti per milione (ppm); minore è il valore di tolleranza impiegato per la ricerca, maggiore è l'affidabilità del risultato ottenuto, mentre un margine di errore troppo ampio potrebbe portare all'identificazione di un falso positivo e non della proteina corretta. I valori di tolleranza da inserire sono, quindi, quello per il peptide parent (es. *Mass Tol MS: ± 2 Da*) e quello per i singoli ioni frammento (es. *MS/MS Tol: ± 1 Da*), che insieme influenzeranno l'identificazione finale. Gli intervalli di tolleranza possono comunque essere ristretti o allargati a piacere, al fine di aumentare o diminuire la significatività statistica dell'analisi. Dunque se diminuisce la tolleranza, aumenta la significatività e viceversa.

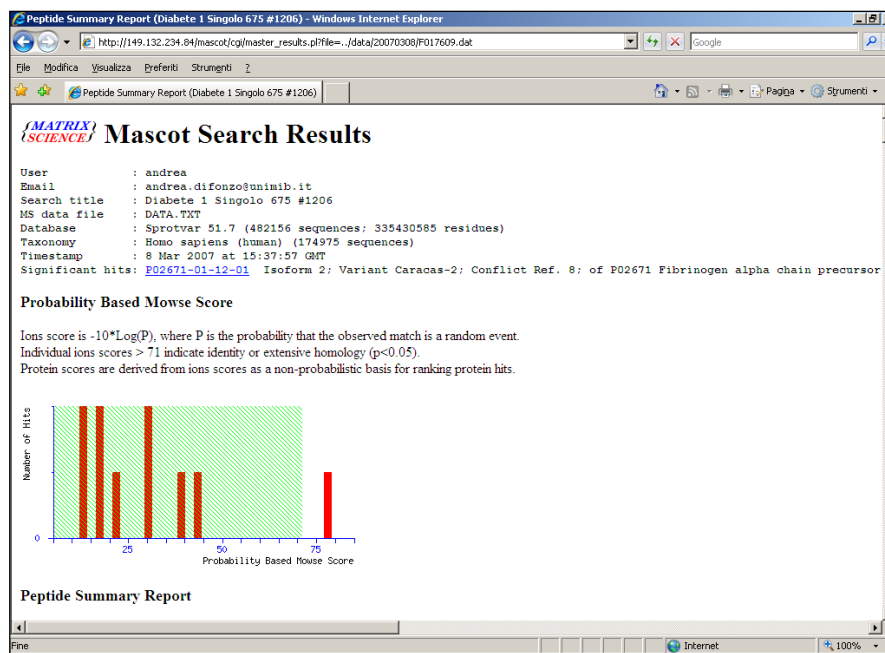
Fra i parametri che, invece, non sono necessari al fine della ricerca, ma che possono essere inseriti, vi è la tassonomia, se conosciuta, dell'organismo da cui deriva la proteina di interesse. Si può inoltre selezionare un intervallo di pesi molecolari (MW) entro il quale far avvenire la ricerca; questo parametro consente di incrementare il potere della ricerca, velocizzando l'identificazione e diminuendo la frequenza di falsi positivi.

In tutti e tre i metodi di ricerca forniti da Mascot, l'algoritmo, chiamato *MOWSE (Molecular Weight Search) scoring algorithm*<sup>235</sup>, classifica le proteine risultanti dalla ricerca in banca dati in base ad uno score che rappresenta una misura della probabilità assoluta (P) che la proteina identificata sia frutto di un evento casuale (un falso positivo) e non la proteina effettivamente analizzata. Lo score è quindi definito come:

$$\text{score} = -10 \cdot \text{Log}_{10} (P)$$

In questo modo, una proteina identificata con uno score elevato, avrà una probabilità molto bassa di essere un falso positivo. Nel caso di analisi MS/MS, non viene dato uno score solamente alla proteina identificata ma anche ad ogni singolo ione riconosciuto (*Ion Score*), per ognuno dei quali ci sarà un valore soglia variabile in base a diversi parametri tra cui la lunghezza della sequenza e la tolleranza scelta per lo ione precursore. I valori di score in rosso sono statisticamente significativi, mentre i valori in nero non sono significativi.

Ogni score è accompagnato da un altro valore, chiamato *expectation value (EV)*, che indica il numero di eventi casuali che potrebbero verificarsi ed essere uguali o migliori; questo indice è equivalente al valore *E-value* ottenuto in una ricerca con la banca dati BLAST. Logicamente, più è basso il valore EV, più significativo è lo score. Mascot fornisce il risultato della ricerca sottoforma di *istogramma*, dove ogni barra rappresenta una determinata proteina e l'area non evidenziata in colore verde indica le proteine statisticamente significative (Figura 44).



**Figura 44.** Istogramma ottenuto da una ricerca con MASCOT.

Al di sotto dell'istogramma, è riportato l'elenco di possibili proteine riconosciute dall'algoritmo *MOWSE* che presentano un grado di similarità compatibile con i dati sperimentali, ordinate in senso decrescente in base al valore di score; di ognuna di esse è possibile visualizzare alcune informazioni generali tra cui il peso molecolare, il punto isoelettrico, lo score (derivato da tutti gli *ions scores*) e l'EV, la funzione e la

copertura della sequenza aminoacidica (in rosso sono evidenziati i tratti di sequenza riconosciuta o meglio i peptidi utilizzati per l'identificazione, mentre in nero quelli non allineati). In particolare, il parametro "Intensity Coverage" indica la percentuale di copertura della sequenza della proteina identificata, cioè i picchi o peptidi che sono stati utilizzati da Mascot e che hanno contribuito al riconoscimento.

In aggiunta, il software fornisce un collegamento diretto alla banca dati *SwissProt* ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) per avere una descrizione più dettagliata della proteina individuata.

**Figura 45.** Mascherina per la ricerca *MS/MS Ion Search* di MASCOT.

I parametri operativi impostati per la ricerca *MS/MS Ion Search* (Figura 45), in questo progetto di ricerca, sono i seguenti:

- *Database*: SwissProt e NCBInr
- *Taxonomy*: Homo sapiens
- *Enzyme*: none
- *Missed cleavages*: none
- *Fixed modifications*: none

- *Variable modifications*: none
- *Parent Mass*: è stato specificato il valore di massa dell'ione precursore
- *Mass tol MS*:  $\pm 1$  Da
- *MS/MS tol*:  $\pm 1$  o  $2$  Da
- *Peptide charge*:  $2+$ ,  $3+$
- *Mass values*: monoisotopica
- *Instrument*: ESI-TRAP.

## CAPITOLO 4

### RISULTATI

#### 4.1 IL CARCINOMA RENALE

La ricerca di biomarcatori del RCC è stata effettuata sia su urine che su siero.

##### 4.1.1 URINE

Questo lavoro si è posto come obiettivo sia quello di verificare su una più ampia casistica i risultati già ottenuti su fluidi biologici di pazienti RCC che di esplorare la ricerca di possibili biomarcatori tramite una diversa fase estrattiva dei peptidi/proteine. Quindi il proteoma urinario di pazienti affetti da RCC e soggetti sani è stato indagato mediante un'estrazione in fase solida con biglie magnetiche associata alla spettrometria di massa. Sono state impiegate due tipologie di microsfere: una a fase inversa di tipo C8 (HIC8-MB) ed una a debole scambio cationico (WCX).

##### **4.1.1.1 DATI OTTENUTI DAI PROFILI PROTEICI DOPO PURIFICAZIONE DEI CAMPIONI CON BIGLIE MAGNETICHE C8**

Lo studio è stato focalizzato innanzitutto sulla validazione dell'efficacia diagnostica di un cluster di segnali precedentemente pubblicato sulla rivista *Proteomics Clinical Applications*<sup>233</sup>, mediante la valutazione del proteoma di una più ampia casistica di pazienti RCC e di soggetti sani. In questo precedente lavoro era stato eseguito uno studio di profiling su campioni di urine mediante tecnologia ClinProt-MALDI-TOF. Era stato costruito un modello diagnostico di tre segnali in grado di classificare correttamente i pazienti con tumore ed i soggetti sani (specificità = 100% e sensibilità = 95%) ed uno di questi peptidi, che risultava sottoespresso nei pazienti ed era caratterizzato dal maggior potere discriminante, è stato identificato in LC-ESI-MS/MS come frammento della glicoproteina uromodulina.

Sono stati studiati nuovi controlli (n = 37) e pazienti affetti da ccRCC (n = 38), allo scopo non solo di validare i dati già pubblicati ma anche di cercare possibili nuovi modelli predittivi ancor più robusti.

##### **4.1.1.1.1 Valutazione del protocollo di purificazione dei campioni**

Inizialmente, si è provveduto a verificare ed a ottimizzare ulteriormente il protocollo di purificazione dei campioni di urine per ottenere una maggiore riproducibilità. A tal proposito, sono stati eseguiti diversi esperimenti provando ad aumentare la soluzione



di eluizione a 10  $\mu$ L e di conseguenza a raddoppiare i volumi dei restanti reagenti (soluzione di legame, biglie magnetiche, soluzione di lavaggio e matrice HCCA). Gli spettri acquisiti confermavano il profilo caratteristico delle urine e presentavano segnali di maggiore intensità; tuttavia tra 2500 e 4000 Da si è notata una perdita in qualità di numerosi picchi, poco risolti rispetto al rumore di fondo. L'analisi aggiuntiva di alcuni campioni di urine già purificati negli anni precedenti ha ribadito l'assenza di segnali nel range di masse sopra riportato qualora si utilizzi questo protocollo. È stato deciso quindi di continuare ad utilizzare il protocollo di prefrazionamento con 5  $\mu$ L di eluizione, che permette quindi di concentrare maggiormente il campione ed evitare comunque problemi di cristallizzazione. Nelle condizioni di lavoro ottimali per la tipologia di target utilizzato (temperatura > 29°C e umidità > 35%) tale metodo di purificazione ha fornito infatti profili spettrali di miglior qualità, meno rumorosi e con un maggior numero di segnali ben distinti.

#### **4.1.1.1.2 Casistica studiata**

Sono stati raccolti campioni di urine provenienti da 37 soggetti controllo (25 uomini e 12 donne) e 38 pazienti pre-intervento affetti da clear cell RCC (urine raccolte il giorno prima dell'intervento) (27 uomini e 11 donne). Tutti i volontari sani e i pazienti avevano preventivamente firmato e dato il consenso alla raccolta dei campioni. L'esame sonografico del tratto urinario su tutti i soggetti controllo è stato eseguito al fine di escludere la presenza di masse renali incidentali.

L'età media dei pazienti era di 64 anni, in un intervallo di 33-86 anni, mentre quella dei controlli risultava di 42 anni, compresa tra 20-65 anni. La casistica dei pazienti in studio era costituita, secondo il sistema di classificazione TNM, per la maggior parte da pazienti allo stadio T1 della patologia (n = 26). I dati relativi alla classificazione tumorale dei pazienti è riassunta in Tabella 13.

L'intera casistica è stata utilizzata per l'identificazione di biomarcatori (*training data set*), mentre per la fase di validazione preliminare dei modelli diagnostici sono state impiegate le urine precedentemente analizzate (*test data set*).

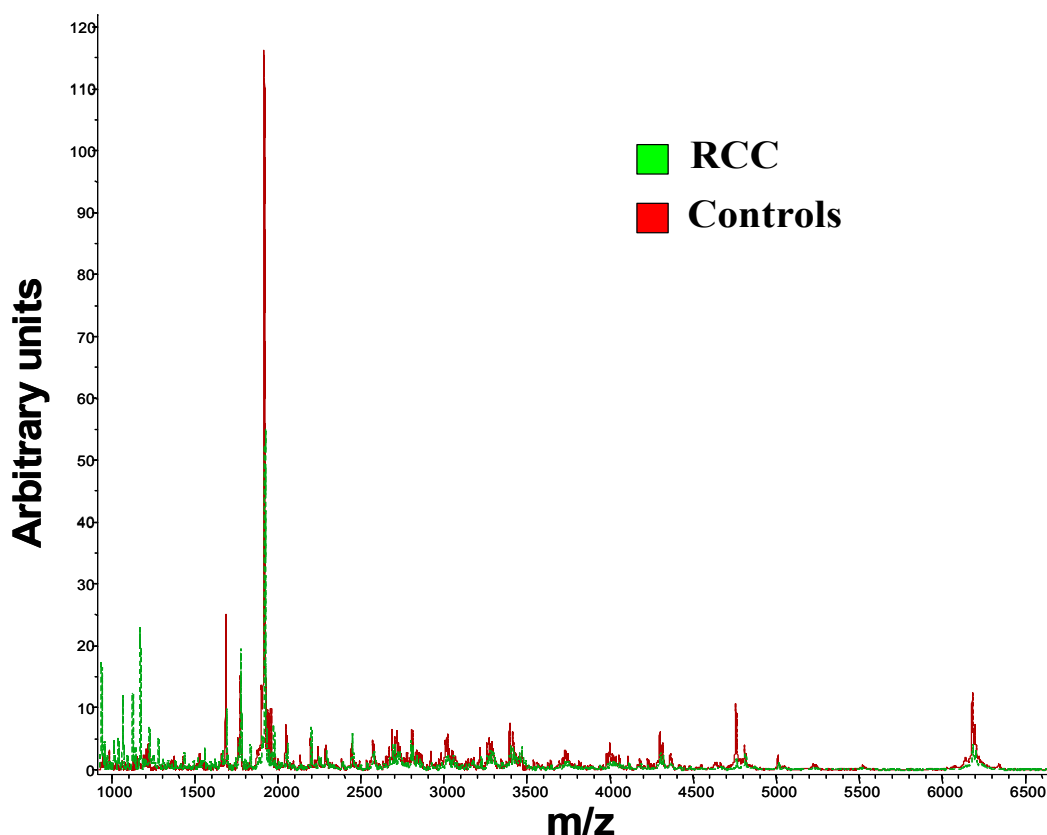
Tumor type <sup>a)</sup>	N° patients	Grade <sup>b)</sup>	N° patients	N <sup>c)</sup>	N° patients	pT <sup>c)</sup>	N° patients
cc-RCC	38	G1	1	NX	21	pT1	26
		G2	28	N0	16	pT2	8
		G3	8	Unknown	1	pT3	3
		Unknown	1			Unknown	1

**Tabella 13.** Classificazione tumorale dei pazienti ccRCC arruolati in questo studio.

a) Sottotipo istologico di tumore; b) Grado tumorale; c) Classificazione TNM.

#### 4.1.1.1.3 *Analisi dei campioni ed elaborazione statistica dei profili proteici*

Il prefrazionamento delle urine è stato eseguito con biglie magnetiche a fase inversa di tipo C8 e i profili spettrali dei campioni sono stati acquisiti in spettrometria di massa MALDI-TOF in modalità lineare positiva in un range di massa da 1 a 10 kDa (Figura 46). I parametri associati al metodo di acquisizione degli spettri di massa sono stati appositamente ottimizzati.



**Figura 46.** Spettro medio dei profili spettrali ottenuti da pazienti RCC e soggetti controllo in MALDI-TOF MS in modalità lineare positiva (range 1-10 kDa).

Innanzitutto è stato verificato che i profili di questi campioni (urine raccolte il giorno prima dell'intervento chirurgico) rispetto a quelli precedentemente analizzati nel progetto (prime urine del mattino raccolte poco prima della nefrectomia) non presentassero differenze di espressione proteica. Sia a livello di numerosità dei segnali che di qualità non sono state rilevate variazioni, inoltre il confronto statistico degli spettri con il programma ClinProTools™ non ha evidenziato peptidi in grado di distinguere i due gruppi di urine. Dunque è stato possibile proseguire lo studio sul RCC con questa nuova e più ampia casistica di campioni e validare i dati ottenuti con le urine già in precedenza pubblicate.

Con il software statistico ClinProTools™ è stato quindi effettuato un confronto tra gli spettri ed un'analisi dei pattern proteici in grado di discriminare le due popolazioni in studio. Il programma ha permesso di rilevare nei profili urinari 122 picchi di elevata intensità e risoluzione. L'indagine statistica ha evidenziato numerosi peptidi la cui intensità nelle due classi risultava statisticamente diversa ( $p < 0,05$ ) (Tabella 14), per i quali è stato calcolato il valore AUC (*area under the curve*) dall'analisi delle rispettive curve ROC (*receiving operating characteristic curve*) al fine di avere una stima della capacità discriminante dei singoli potenziali marcatori.

È stato innanzitutto valutato il modello precedentemente pubblicato<sup>233</sup> su questa nuova casistica e, successivamente sono stati creati e valutati nuovi pattern potenzialmente utili ai fini diagnostici.

Mass	PTTA <sup>a</sup>	PWKW <sup>b</sup>	Ave1 <sup>c</sup>	Ave2 <sup>d</sup>	StdD1 <sup>e</sup>	StdD2 <sup>f</sup>
1914.62*	< 0.000001	< 0.000001	859.68	510.89	249.77	198.41
1898.35*	< 0.000001	< 0.000001	42.12	22.17	14.93	10.53
2685.69	0.0000027	< 0.000001	10.02	17.78	4	6.65
2043.17	0.00000294	< 0.000001	21.43	9.63	8.54	8.73
2049.69	0.0000155	< 0.000001	-2.91	4.88	2.92	7.82
2700.5	0.0000466	< 0.000001	2.2	11.2	2.99	9.76
1872.42	0.000308	0.000532	17.05	9.79	7.07	6.64
3486.41	0.000308	0.000418	5.34	10.86	3.66	6.35
5010.4	0.000347	0.000532	15.15	9.23	5.75	5.66
2716.52	0.000722	0.00094	32.38	20.52	12.67	11.39
2830.44	0.000722	0.000161	4.26	14.55	5.61	13.4
1670.43*	0.0065	0.0239	-0.4	2.08	1.39	4.13
1827.36*	0.0182	0.0327	11.06	29.27	11.75	35.24
4226.2	0.0267	0.0231	11.78	7.11	8.25	6.18
3743.42	0.0267	0.0442	6.55	9.4	4.26	4.74
3255.15*	0.0267	0.0506	11.47	8.86	4.14	4.13
4052.35	0.0365	0.0357	11.6	7.93	6.52	5.6

**Tabella 14.** Elenco di alcuni ioni differentemente espressi in modo significativo ( $p < 0,05$ ) tra controlli ( $n = 37$ ) e pazienti ccRCC ( $n = 38$ ) utilizzati nella *training phase*. a) p-value calcolato con un t-test o ANOVA; valori inferiori a 0,05 indicano una rilevanza statistica. b) p-value secondo il test Wilcoxon o test Kruskal Wallis; valori inferiori a 0,05 indicano una rilevanza statistica. c) Area media per ogni picco nei controlli. d) Area media per ogni picco nei pazienti RCC. e) Deviazione standard di ogni segnale nei controlli. f) Deviazione standard di ogni segnale nei pazienti RCC.

\* I picchi evidenziati con un asterisco sono gli ioni selezionati nei modelli diagnostici.

#### 4.1.1.1.4 Efficacia diagnostica dei pattern e validazione

Il cluster di segnali precedentemente pubblicato <sup>233</sup>, che era in grado di differenziare i soggetti sani dai pazienti affetti da RCC con ottimi valori di sensibilità e specificità, riconferma la sua capacità diagnostica solo in parte; infatti i peptidi a  $m/z$  1827, 1914 e 1968 risultavano ancora differentemente espressi in modo significativo e capaci di separare le due popolazioni, ma perdevano in efficacia diagnostica. L'indice di *performance* di questi tre ioni presi singolarmente era diminuito rispetto ai valori rilevati nel precedente studio (Tabella 15), indicando un test con moderata accuratezza <sup>234</sup>.

<i>m/z</i>	p-value (T-test/ANOVA)	p-value (Wilcoxon/Kruskal Wallis)	AUC
1827	0.0182	0.0327	0,672
1914	< 0.000001	< 0.000001	0,865
1968	0.247	0.00491	0,720

**Tabella 15.** Valori AUC determinati mediante analisi delle curve ROC di ciascun segnale utilizzato nel cluster precedentemente pubblicato <sup>233</sup>.

AUC=0.5	non-informative test
0.5<AUC≤0.7	less accurate
0.7<AUC≤0.9	moderately accurate
0.9<AUC<1	highly accurate and
AUC=1	perfect tests

**Figura 36.** Interpretazione dei valori AUC ottenuti dall'analisi della curva ROC per la misura dell'accuratezza di un modello diagnostico <sup>234</sup>.

L'utilizzo di questo pattern sui campioni di urine attuali porta ad una riduzione della capacità discriminante, infatti risulta possedere una specificità del 89% ed una sensibilità del 84%.

Successivamente, mediante l'*algoritmo genetico* (GA) sono stati individuati nuovi segnali con forte potere discriminante, i quali permettevano di creare un nuovo modello migliore per la separazione dei pazienti dai soggetti controllo.

I picchi a *m/z* 1898 e 3255 (entrambi sottoespressi nei pazienti ccRCC) ( $p < 0.05$ ) mostravano singolarmente buoni valori di sensibilità e specificità e se utilizzati insieme ai segnali a *m/z* 1827 e 1914 rafforzavano l'efficacia diagnostica innalzando la specificità al 92% e confermando il valore di sensibilità a 84% (Figura 47A). La validazione esterna, mediante utilizzo dei campioni di urine analizzati negli anni precedenti (*test data set*) e non inclusi nella generazione del modello, ha riportato una specificità del 90% ed una sensibilità del 88%.

L'ulteriore aggiunta a tale cluster del picco a *m/z* 1670 consente, nella fase di *training*, di mantenere la specificità sullo stesso valore precedente (92%) ma soprattutto di migliorare la sensibilità innalzandola a 92% (Figura 47B). L'espressione di quest'ultimo ione risulta infatti aumentata e statisticamente diversa ( $p < 0.05$ ) nei pazienti con tumore rispetto ai controlli. Nella validazione esterna, invece, sempre

con i campioni di urine purificati negli anni precedenti, le percentuali di specificità e sensibilità rimangono pressoché costanti (specificità = 83%, sensibilità = 88%).

Recognition Capability				<b>A</b>
<b>Overall:</b>		88.05 %		
Class 1:		91.89 %		
Class 2:		84.21 %		
Integration Regions used for Classification				
Index	Mass	Start Mass	End Mass	
23	1670.43	1667.73	1673.55	
28	1827.36	1820.15	1838.22	
31	1898.35	1889.05	1903.52	
32	1914.62	1907.67	1928.67	
61	3255.15	3249.11	3261.84	

Recognition Capability				<b>B</b>
<b>Overall:</b>		92 %		
Class 1:		91.89 %		
Class 2:		92.11 %		
Integration Regions used for Classification				
Index	Mass	Start Mass	End Mass	
23	1670.43	1667.73	1673.55	
28	1827.36	1820.15	1838.22	
31	1898.35	1889.05	1903.52	
32	1914.62	1907.67	1928.67	
61	3255.15	3249.11	3261.84	

**Figura 47.** Rapporti forniti dal software ClinProTools™ relativamente alla capacità diagnostica dei due modelli creati. **A)** Indici di *performance* del primo cluster (4 picchi). **B)** Indici di *performance* del secondo cluster (5 picchi). Classe 1 = controlli, classe 2 = pazienti ccRCC.

#### **4.1.1.2 DATI OTTENUTI DAI PROFILI PROTEICI DOPO PURIFICAZIONE DEI CAMPIONI CON BIGLIE MAGNETICHE WCX**

Lo studio del Renal Cell Carcinoma (RCC) su campioni di urine è stato proseguito presso l'Unità di Spettrometria di Massa Biomolecolare del "Leiden University Medical Center (LUMC)" in Leiden (The Netherlands). È stata innanzitutto implementata ed ottimizzata una diversa procedura di purificazione dei campioni, sempre altamente standardizzata e automatizzata, su una casistica ancora più ampia di soggetti controllo e pazienti RCC. Le urine sono state analizzate mediante estrazione in fase solida con biglie magnetiche a debole scambio cationico (WCX), al fine di caratterizzarne il proteoma e individuare significative differenze di espressione per costruire adeguati modelli diagnostici. Sono state poi studiate anche altri tipi di tumore renale (non-RCC) per valutare la specificità dei modelli creati e/o per identificarne di nuovi utili per comprendere meglio i meccanismi di insorgenza.

##### **4.1.1.2.1 Casistica studiata**

Sono stati analizzati campioni di urine di 85 soggetti controllo (58 uomini e 27 donne) e 102 pazienti con tumore renale (64 uomini e 38 donne). Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono riportate in Tabella 16. Tutti i volontari sani e i pazienti avevano preventivamente firmato e dato il consenso alla raccolta dei campioni. Le urine dei pazienti sono state raccolte il giorno prima dell'intervento chirurgico.

L'età media dei controlli era di 45 anni, in un intervallo di 30-68 anni, mentre quella dei pazienti risultava di 64 anni, compresa tra 33-88 anni. I pazienti RCC sono stati classificati secondo il sistema di classificazione TNM. L'analisi istologica è stata eseguita sui pazienti al fine di determinare grado tumorale, sottotipo istologico, differenziazione sarcomatoide e cistica, necrosi ed infiltrazione tumorale. È stato possibile classificare il gruppo patologico in pazienti affetti da clear cell RCC (ccRCC) (n = 79) e pazienti con diverse forme tumorali non di tipo ccRCC (non-ccRCC) (n = 23).

	N° PATIENTS
<b>ALL</b>	102
<b>Mean ± SD age at diagnosis</b>	64 ± 12.4
<b>Median age at diagnosis (range)</b>	33 - 88
<b>GENDER</b>	
<b>Males</b>	64
<b>Females</b>	38
<b>STAGING <sup>a)</sup></b>	
<b>Primary Tumor (T)</b>	
<i>pT1</i>	57
<i>pT2</i>	14
<i>pT3</i>	17
<i>pT4</i>	1
<i>unknown</i>	3
<b>Regional lymph nodes (N)</b>	
<i>NX</i>	59
<i>N0</i>	27
<i>N1</i>	1
<i>unknown</i>	5
<b>GRADE <sup>b)</sup></b>	
<b>G1</b>	6
<b>G2</b>	62
<b>G3</b>	17
<b>G4</b>	1
<i>unknown</i>	6
<b>HYSTOLOGY <sup>c)</sup></b>	
<b>Clear cell RCC</b>	79
<b>Papillary RCC</b>	7
<b>Oncocytoma</b>	6
<b>Other subtypes</b>	10
<b>TUMOR TYPE</b>	
<b>Malignant</b>	92
<b>Benign</b>	10

**Tabella 16.** Dati clinici dei pazienti arruolati nello studio.

a) Classificazione TNM;

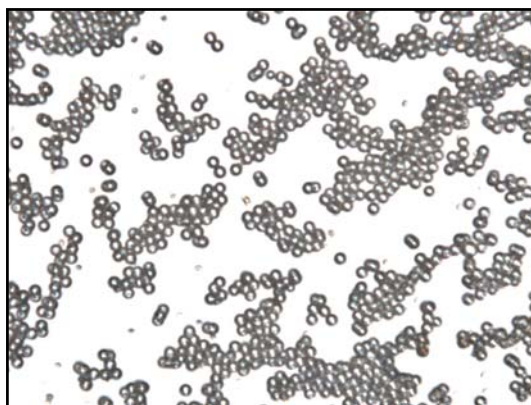
b) Grado tumorale;

c) Sottotipo istologico di tumore.

#### 4.1.1.2.2 *Analisi dei campioni ed elaborazione statistica dei profili proteici*

Il prefrazionamento delle urine è stato eseguito mediante estrazione in fase solida con biglie magnetiche a debole scambio cationico, utilizzando un Robot Hamilton a 96 canali. Il kit di profiling è stato verificato prima del suo impiego attraverso una valutazione della dispersione e aggregazione presenti nella sospensione di biglie.

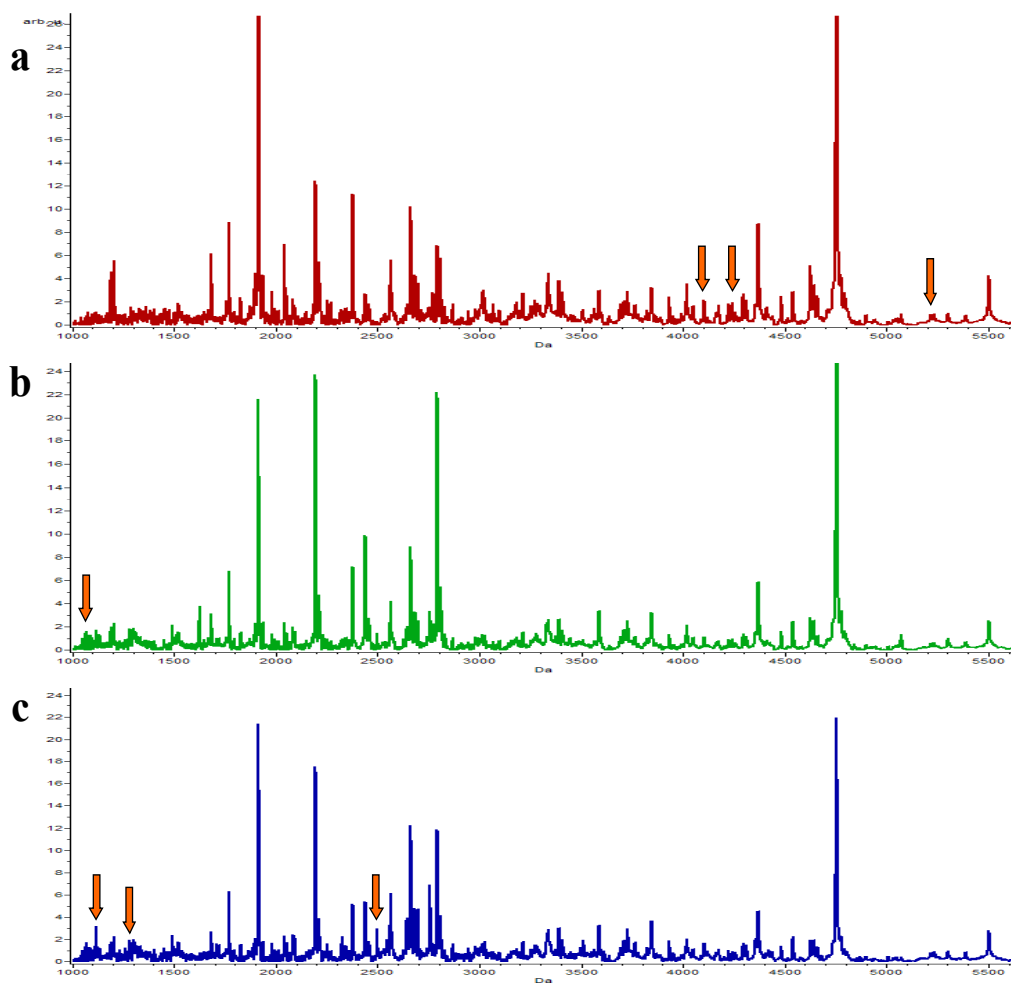
In Figura 48 è riportata un'immagine delle biglie WCX, come esempio di ottima qualità funzionale.



**Figura 48.** Sospensione di biglie magnetiche WCX al microscopio ottico

I profili spettrali dei campioni sono stati acquisiti in spettrometria di massa MALDI-TOF in modalità lineare positiva in un range di massa da 1 a 12 kDa. Gli spettri di massa così ottenuti sono stati processati con il software FlexAnalysis<sup>TM</sup>; innanzitutto è stata applicata una sottrazione della linea di base, poi gli spettri sono stati allineati utilizzando i picchi più frequenti nei profili acquisiti; quattro ioni (valori medi assegnati a tali picchi sono:  $m/z$  1914,3, 2194,4, 2792,5 e 4753,5) sono stati scelti sulla base di una osservazione manuale degli spettri, al fine di creare una lista di masse di controllo per la calibrazione. È seguita quindi una valutazione statistica in modo tale da individuare potenziali marcatori per una diagnosi precoce del RCC. Già da come si può notare in Figura 49, sono presenti varie regioni spettrali con picchi differentemente espressi nelle tre popolazioni in studio.





**Figura 49.** Spettro di massa del profilo medio dei controlli (a), pazienti ccRCC (b) e non ccRCC (c) ottenuto dopo purificazione delle urine con biglie magnetiche WCX. Le frecce indicano i segnali inclusi nei modelli diagnostici.

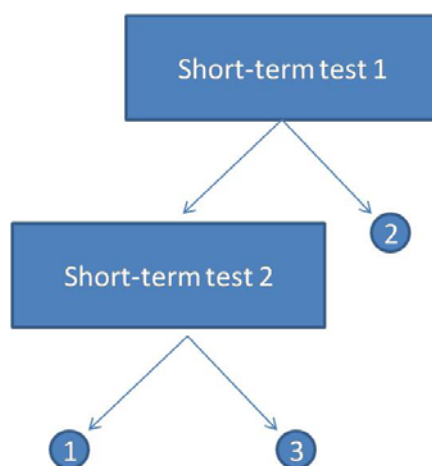
L'elaborazione degli spettri è stata condotta con il programma statistico ClinProTools™ e con l'aiuto del Dipartimento di Informatica Sistemistica e Comunicazione dell'Università Milano-Bicocca (Dr. Italo Zoppis, Prof. Giancarlo Mauri). L'obiettivo è stato appunto quello di selezionare patterns di peptidi in grado di discriminare meglio i pazienti tumorali (ccRCC e non-ccRCC). Dall'analisi statistica dei profili proteici di controlli, pazienti ccRCC e non-ccRCC è stato possibile evidenziare circa 120 picchi, numerosi dei quali con intensità statisticamente diversa ( $p < 0,05$ ) in grado di separare i soggetti sani dai tumorali (Tabella 17).

Mass	PTTA <sup>a</sup>	PWKW <sup>b</sup>	Ave1 <sup>c</sup>	Ave2 <sup>d</sup>	Ave3 <sup>e</sup>	StdD1 <sup>f</sup>	StdD2 <sup>g</sup>	StdD3 <sup>h</sup>
1279.07*	< 0.000001	< 0.000001	-0.53	3.67	3.88	1.56	3.94	5.57
1067.37*	< 0.000001	< 0.000001	1.15	4.31	4.66	0.82	3.35	4.26
1914.82	< 0.000001	< 0.000001	246.67	77.56	76.89	185.36	73.73	64.95
1294.73	< 0.000001	< 0.000001	-0.02	2.85	3.34	1.39	3	3.67
3270.56	< 0.000001	< 0.000001	10.61	1.85	5.16	6.46	7.77	9.4
2043.09	< 0.000001	< 0.000001	24.39	8.7	7.36	18.7	8.65	10.53
4660.69	< 0.000001	< 0.000001	13.25	5.98	6.9	7.27	6.3	6.71
2378.4	< 0.000001	< 0.000001	45.91	28.64	22.83	22.04	20.43	13.99
4296.09	< 0.000001	< 0.000001	14.02	6.84	8.39	6.71	6.89	7
1490.8	< 0.000001	< 0.000001	0.73	3.9	3.37	2.25	3.57	4.14
1683.43	0.000001	< 0.000001	19.7	9.49	7.52	12.64	10.97	8.52
4104.04*	0.00000183	< 0.000001	11.9	5.15	8.99	6.9	6.56	8.37
4625.97	0.00000757	0.00000123	27.27	13.61	9.71	20.61	15.59	11.37
2270.39	0.0000119	0.00000429	6.22	2.41	2.67	4.91	3.87	3.39
3692.13	0.0000159	0.00000222	8.98	4.02	4.72	5.26	6.4	5.53
1189.89	0.0000194	0.00000109	12.36	5.02	4.51	10.89	5.88	6.39
4794.13	0.0000216	< 0.000001	11.25	5.36	3.55	9.86	6.9	4.87
4369.81	0.000309	0.0000197	54.14	34.66	25.52	38.88	29.99	23.84
4258.1*	0.000339	0.0000528	5.59	2.69	2.89	3.91	4.16	5.58
5219.06*	0.0461	0.0643	3.5	2.02	3.7	3.57	3.66	3.78

**Tabella 17.** Elenco di alcuni ioni differentemente espressi in modo significativo ( $p < 0,05$ ) tra controlli (classe = 1), pazienti ccRCC (classe = 2) e non ccRCC (classe = 3). a) p-value calcolato con un t-test o ANOVA; valori inferiori a 0,05 indicano una rilevanza statistica. b) p-value secondo il test Wilcoxon o test Kruskal Wallis; valori inferiori a 0,05 indicano una rilevanza statistica. c-d-e) Area media per ogni picco rispettivamente nei controlli, pazienti ccRCC e pazienti non-ccRCC. f-g-h) Deviazione standard di ogni segnale rispettivamente nei controlli, pazienti ccRCC e pazienti non-ccRCC.

\* I picchi evidenziati con un asterisco sono alcuni degli ioni selezionati nei modelli diagnostici.

Sono stati costruiti due cluster, di tre e cinque segnali rispettivamente, utilizzando l'algoritmo *support vector machine* (SVM). Questi modelli permettevano di separare le tre popolazioni in studio mediante un processo decisionale in sequenza (Figura 50); nello specifico, è stato applicato inizialmente il primo cluster ( $m/z$  1067, 1279, 4104) al fine di discriminare i controlli e i pazienti non-ccRCC dalla restante classe (pazienti ccRCC). Successivamente è stato utilizzato il secondo pattern ( $m/z$  1117, 1279, 2498, 4258, 5219) per distinguere di conseguenza i soggetti sani e i pazienti non-ccRCC. Quindi tutti i pazienti non classificati come ccRCC nella prima fase decisionale, sono poi stati evidenziati nel secondo e conclusivo step diagnostico discriminandoli dai soggetti controllo.



**Figura 50.** Processo decisionale impiegato sui dati ottenuti da purificazione con biglie magnetiche WCX delle urine di controlli (classe 1), pazienti ccRCC (classe 2) e pazienti non-ccRCC (classe 3). Nei nodi sono indicati i due modelli predittivi ottenuti con l’algoritmo *support vector machine* (SVM) ed applicati per la classificazione dei soggetti. Ogni freccia corrisponde ad una possibile decisione e quindi alla popolazione discriminata.

#### 4.1.1.2.3 Efficacia diagnostica dei pattern

Nelle Tabelle 18 e 19 sono riportati gli ottimi valori percentuali di sensibilità (Sensit) e specificità (Specif), superiori ad 82%, ottenuti dall’applicazione dei due cluster di segnali selezionati. Come è possibile notare, anche i valori di predittività sono risultati superiori all’80%, indicando un adeguato indice di precisione nella classificazione. Infine in Tabella 20 vengono riportate le rispettive probabilità che il modello nel suo complesso inferisca ciascuna delle classi di appartenenza, condizionata ai risultati ottenuti dei modelli.

	True 1,3	True 2	Pred.
<b>Mod. out 1,3</b>	78	6	92,86%
<b>Mod. out 2</b>	10	41	80,39%
<b>Sensit., Specif.</b>	88,64%	87,23%	

**Tabella 18.** Valori ottenuti dalla applicazione del primo modello predittivo. Classe 1 = controlli, classe 2 = pazienti ccRCC e classe 3 = pazienti non-ccRCC. Nel test statistico, la classe 1,3 è stata assunta come positiva.

	True 1	True 3	Pred.
<b>Mod. out 1</b>	85	4	95,51%
<b>Mod. out 3</b>	0	19	100%
<b>Sensit., Specif.</b>	100%	82,61%	

**Tabella 19.** Valori ottenuti dalla applicazione del secondo modello predittivo. Classe 1 = controlli e classe 3 = pazienti non-ccRCC. Nel test statistico, la classe 1 è stata assunta come positiva.

	$T_1 = 1, T_2 = 1$	$T_1 = 1, T_2 = 0$
$Pr (C(x) = 1   T_1, T_2)$	$\approx 0.9$	$\approx 0$
$Pr (C(x) = 3   T_1, T_2)$	$\approx 0.03$	$\approx 0.76$

**Tabella 20.** *Decision-tree inference.* Distribuzione di probabilità sulle popolazioni.

#### 4.1.2 SIERO

Il seguente studio, pubblicato sulla rivista *Urology* nel 2010<sup>236</sup>, è stato focalizzato sulla valutazione del proteoma di campioni di siero da pazienti RCC mediante approccio ClinProt-MALDI-TOF. L'obiettivo è sempre quello di identificare biomarcatori multipli da utilizzare a scopo diagnostico.

##### 4.1.2.1 Casistica studiata

Sono stati raccolti campioni di siero provenienti da 29 soggetti sani (16 uomini e 13 donne) e 33 pazienti affetti da clear cell RCC (17 uomini e 16 donne). Tutti i volontari sani e i pazienti avevano preventivamente firmato e dato il consenso alla raccolta dei campioni. L'esame sonografico del tratto urinario è stato eseguito su tutti i soggetti controllo al fine di escludere la presenza di masse renali incidentali.

L'età media dei pazienti era di 64,5 anni, in un intervallo di 37-88 anni, mentre quella dei controlli risultava di 44,9 anni, compresa tra 33 e 62 anni. Lo stadio della malattia, valutato secondo il sistema di classificazione TNM, ha evidenziato che la maggior parte dei pazienti si trovava nello stadio T1 della patologia ( $n = 20$ ), quindi in una situazione in cui non sono ancor presenti manifestazioni cliniche evidenti del processo neoplastico; la parte restante della casistica studiata era invece composta da pazienti allo stadio T2 ( $n = 5$ ) e T3 ( $n = 8$ ), condizione in cui la prognosi risulta invece molto più incerta. I dati relativi alla classificazione tumorale dei pazienti è riassunta in Tabella 21.

Tumor type <sup>a)</sup>	N° patients	Grade <sup>b)</sup>	N° patients	N <sup>c)</sup>	N° patients	pT <sup>c)</sup>	N° patients	(A)	(B)
cc-RCC	32	G1	0	NX	26	pT1	20	11	9
Papillary	0	G2	28	N0	7	pT2	5	4	1
Papillary type	0	G3	4			pT3	8	5	3
Mixture of cc-RCC and papillary	1	G4	1			pT4	0		

**Tabella 21.** Classificazione tumorale dei pazienti RCC arruolati in questo studio. I pazienti e i soggetti controllo sono stati suddivisi “random” in due gruppi: *training phase* (A) per la ricerca di potenziali biomarcatori e *test phase* (B) per la validazione esterna.

a) Sottotipo istologico di tumore; b) Grado tumorale; c) Classificazione TNM.

L’indagine istologica mostrava che tutti i pazienti erano affetti dalla variante a cellule chiare del tumore (ccRCC), eccetto un solo paziente colpito da ccRCC misto con RCC papillare. L’intera casistica è stata suddivisa in modo casuale in due gruppi (tabella 21) per l’identificazione di biomarcatori (*training data set*: 20 controlli e 20 pazienti ccRCC) e per la fase di validazione preliminare del cluster diagnostico (*test data set*: 9 controlli e 13 pazienti ccRCC).

#### **4.1.2.2 Analisi dei campioni ed elaborazione statistica dei profili proteici**

Il prefrazionamento del proteoma sierico, prima dell’analisi in MS, è stato eseguito mediante estrazione in fase solida con biglie magnetiche a fase inversa di tipo C8 (HIC8-MB).

I profili spettrali dei campioni sono stati acquisiti in spettrometria di massa MALDI-TOF in modalità lineare positiva in un range di massa da 1 a 10 kDa. I parametri del metodo di acquisizione sono stati ottimizzati al fine di ottenere profili ricchi di segnali ben distinti e risolti rispetto al rumore di fondo. I campioni sono stati analizzati in doppio e un totale di otto spettri per ciascun campione sono stati ottenuti mediante procedura di deposito su target in quadruplicato.

L’elaborazione degli spettri acquisiti e l’analisi dei pattern proteici è stata eseguita con il programma statistico ClinProTools™. Data l’elevata complessità dei profili spettrali, due algoritmi matematici, l’*algoritmo genetico* (GA) e la *support vector machine* (SVM), sono stati impiegati per l’identificazione di biomarcatori multipli in grado di discriminare i pazienti dai soggetti sani. Il confronto dei profili proteici

ottenuti dai campioni inclusi nella *training phase* ha mostrato la presenza di numerosi ioni differentemente espressi nelle due popolazioni in esame e statisticamente significativi (tabella 22). Sulla base dei risultati ottenuti con gli algoritmi, è stato individuato un cluster di 3 peptidi, *m/z* 1083, 1445 e 6879, con espressione alterata e significativa statisticamente ( $p < 0,05$ ) in grado di discriminare le due classi. I segnali a *m/z* 1083 e 6879 risultavano sottoespressi, mentre il picco a *m/z* 1445 sovraespresso, nei pazienti ccRCC rispetto ai controlli.

#### 4.1.2.3 Efficacia diagnostica del pattern e validazione

In Tabella 23 sono riportati i valori AUC (*area under the curve*) ottenuti, con il software MedCalc<sup>®</sup>, dall'analisi delle curve ROC (*receiving operating characteristic curve*) dei tre marcatori singolarmente.

Mass	PTTA <sup>a</sup>	PWKW <sup>b</sup>	Ave1 <sup>c</sup>	Ave2 <sup>d</sup>	StdD1 <sup>e</sup>	StdD2 <sup>f</sup>
1082.7*	0.00112	7.57E-05	75.98	35.51	28.04	21.73
1514.15	0.00488	0.0023	20.45	40.86	7.75	18.23
1034.9	0.00608	0.0023	167.23	84.59	70.87	55.59
1223.67	0.00608	0.00298	14.22	4.54	8.98	5.29
6878.74*	0.00772	0.0059	5.63	2.07	3.28	2.38
1010.42	0.00855	0.00379	277.13	171.1	91.92	84.41
1445.04*	0.00941	0.0031	-0.52	4.36	2.52	5.1
1461.03	0.0168	0.0116	115.36	257.76	52.05	166.29
1440.03	0.0195	0.013	1.85	-1.08	2.6	2.91
6939.3	0.0195	0.0184	2.23	0.59	1.73	1.35
7562.98	0.0287	0.0147	0.77	2.36	0.69	2.05
1059.24	0.0291	0.0208	70.85	44.6	27.51	25.81
1258.45	0.0291	0.0607	24.5	45.88	15.23	26.41
1557.55	0.0302	0.0267	19.98	29.12	7.91	10.77
7762.21	0.0311	0.0267	19.02	12.52	8.27	4.7
1413.79	0.0365	0.122	2.56	6.41	3.57	4.65
2929.81	0.041	0.00662	21.07	40.62	10.75	27.67

**Tabella 22.** Selezione di alcuni ioni differentemente espressi in modo significativo ( $p < 0,05$ ) tra controlli ( $n = 20$ ) e pazienti ccRCC ( $n = 20$ ) utilizzati nella *training phase*. a) p-value calcolato con un t-test o ANOVA; valori inferiori a 0,05 indicano una rilevanza statistica. b) p-value secondo il test Wilcoxon o test Kruskal Wallis; valori inferiori a 0,05 indicano una rilevanza statistica. c) Area media per ogni picco nei controlli. d) Area media per ogni picco nei pazienti RCC. e) Deviazione standard di ogni segnale nei controlli. f) Deviazione standard di ogni segnale nei pazienti RCC.

\* I picchi evidenziati con un asterisco sono gli ioni selezionati nel modello diagnostico.

<i>m/z</i>	p-value (T-test/ANOVA)	p-value (Wilcoxon/Kruskal Wallis)	AUC
1083	0,00112	7,57E-05	0,933
1445	0,00941	0,0031	0,852
6879	0,00772	0,0059	0,770

**Tabella 23.** Valori AUC determinati mediante analisi delle curve ROC di ciascun segnale utilizzato nel cluster discriminante le due popolazioni in studio.

Il picco a *m/z* 1083 ( $p = 0,0001$ ) ha mostrato un'elevata accuratezza diagnostica con un valore AUC di 0,933<sup>234</sup>.

AUC=0.5	non-informative test
0.5<AUC≤0.7	less accurate
0.7<AUC≤0.9	moderately accurate
0.9<AUC<1	highly accurate and
AUC=1	perfect tests

**Figura 36.** Interpretazione dei valori AUC ottenuti dall'analisi della curva ROC per la misura dell'accuratezza di un modello diagnostico<sup>234</sup>.

La sensibilità e specificità di questo segnale erano 90% e 95%, rispettivamente.

Gli ioni a *m/z* 1445 ( $p = 0,0001$ ) e 6879 ( $p = 0,0003$ ) presentavano valori AUC rispettivamente di 0,852 e 0,770, indicativi di un test con moderata accuratezza.

L'utilizzo contemporaneo di tutti e tre i marcatori ha consentito di avere un miglioramento dell'efficacia diagnostica con un valore di specificità del 100% ed una sensibilità del 90% (Tabella 24: *training phase*). Questo modello diagnostico è stato successivamente sottoposto ad una validazione esterna utilizzando i dati ottenuti dai campioni inclusi nella *test phase*, al fine di convalidare la sua capacità discriminante. L'elaborazione ha evidenziato che il modello possiede una sensibilità del 92% ed una specificità del 100% (Tabella 24: *test phase*).

Group	Sensitivity	Specificity
Training phase (20 controls and 20 ccRCC)	90%	100%
Test phase (9 controls and 13 ccRCC)	92%	100%

**Tabella 24.** Valutazione dell'efficacia diagnostica del cluster selezionato: sensibilità e specificità calcolate sul *training data set* e *test data set*.

Inoltre, con l'aiuto del Dipartimento di Informatica Sistemistica e Comunicazione dell'Università Milano-Bicocca (Dr. Italo Zoppis, Prof. Giancarlo Mauri), è stata eseguita un'analisi *cross-validation* mediante ricampionamento dei gruppi *training* e *test* sull'intera casistica, per tre volte consecutive e sempre in modo casuale, così da valutare se i risultati estremamente positivi possono essere imputabili al fatto di aver suddiviso l'intera casistica in due gruppi una sola volta. I risultati mostravano una sensibilità dell'88% ed una specificità del 96% (AUC = 0,965). I valori AUC calcolati per ciascuna delle tre fasi di analisi erano 0,955, 0,96 e 0,972 per il gruppo *test*. Nella terza fase, quella con il più alto valore AUC, il modello è stato ulteriormente valutato suddividendo l'intero gruppo di pazienti sulla base dello stadio tumorale (Tabella 25).

pT	N° patients	Sensitivity
1	20	85 %
2	5	100 %
3	8	100 %

**Tabella 25.** Efficacia diagnostica del cluster a seconda del pT (stadio tumorale) dei pazienti coinvolti nello studio.

Questi dati mostrano come il modello sia in grado di riconoscere con un 100% di sensibilità i pazienti al pT2 (n = 5) e pT3 (n = 8), e con una sensibilità di 85% i pazienti al pT1 (n = 20).

#### 4.1.2.4 Livelli di espressione dei biomarcatori

Come precedentemente riportato, i segnali a  $m/z$  1083 e 6879 risultavano sottoespressi, mentre il picco a  $m/z$  1445 sovraespresso, nei pazienti ccRCC rispetto ai controlli. È stata, inoltre, valutata con il software MedCalc® l'espressione dei tre marcatori durante la progressione della patologia tumorale; si è osservato come l'area/intensità dei picchi a  $m/z$  1083 e 6879 diminuisca progressivamente dallo stadio pT1 allo stadio pT3, mentre il picco a  $m/z$  1445 aumenti negli stadi pT1 e pT2



(Figura 51). Da questi dati emerge quindi una possibile correlazione tra lo stadio del tumore e il livello di espressione dei marcatori individuati.

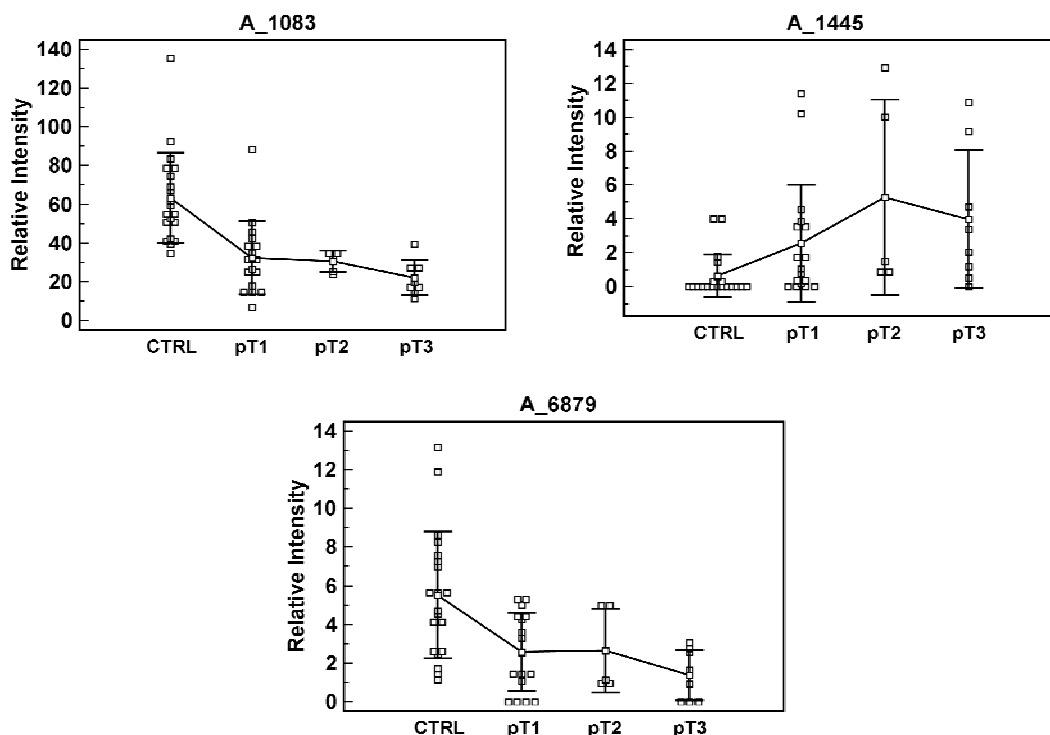


Figura 51. Variazione dell'intensità dei tre marcatori in base allo stadio della malattia tumorale.

## 4.2 LA NEFROPATIA DIABETICA

### 4.2.1 SIERO

Il seguente lavoro di ricerca, pubblicato sulla rivista *Journal of Proteomics* nel 2010<sup>237</sup>, è stato focalizzato sulla valutazione del proteoma di campioni di siero da pazienti diabetici con e senza nefropatia mediante approccio ClinProt-MALDI-TOF. Attualmente non sono disponibili biomarcatori validi nella diagnosi precoce dell'insorgenza di nefropatia in pazienti con diabete mellito di tipo 1. Questo lavoro rappresenta uno studio pilota, che ha dunque lo scopo di identificare marcatori proteici predittivi di un aumentato rischio di sviluppare nefropatia diabetica.

#### 4.2.1.1 Casistica studiata

Campioni di siero di 9 soggetti controllo, 10 pazienti diabetici di tipo 1 (T1D) e 4 pazienti diabetici con nefropatia (T1DN) sono stati raccolti presso l'Ospedale San Gerardo di Monza e l'Ospedale San Raffaele di Milano. Tutti i volontari sani e i pazienti avevano preventivamente firmato e dato il consenso alla raccolta dei campioni.

I dati clinici relativi ai pazienti diabetici e ai soggetti sani sono riassunti nella Tabella 26.

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame clinico e misurazione della pressione arteriosa con uno sfigmomanometro a mercurio dopo 5 minuti di riposo; la pressione è stata misurata tre volte a intervalli di 2 minuti ed espressa come media delle tre rilevazioni. Inoltre, i pazienti diabetici sono stati suddivisi in due categorie sulla base del livello di escrezione urinaria di albumina; gli stadi clinici di normoalbuminuria e microalbuminuria sono stati definiti come AER medio inferiore o maggiore di 20 µg/min nella raccolta urinaria temporizzata (tre raccolte consecutive overnight) (Tabella 27).

	Type 1 diabetes	Type 1 diabetes with albuminuria	Control subjects
Age at visit (yrs)	36.5 ± 1.5	32.0 ± 0.7	37.5 ± 9.0
Duration of Diabetes (yrs)	28.5 ± 2.2	24.0 ± 2.4	-----
BMI (Body Mass Index)	23.1 ± 0.6	23.0 ± 0.7	23.4 ± 0.8
HbA1c (%)	7.8 ± 0.4	6.4 ± 0.6	-----
Systolic blood pressure (mm Hg)	118.5 ± 12.9	125.0 ± 2.8	115.5 ± 11.3
Diastolic blood pressure (mm Hg)	79.0 ± 5.7	78.7 ± 2.5	80.5 ± 3.0
Sex (F/M)	4/6	1/3	3/6
Smoke (yes/no)	1/2	0/2	0/0

**Tabella 26.** Caratteristiche cliniche dei pazienti con diabete mellito di tipo 1 e dei soggetti controllo. I dati sono media ± SEM (errore standard della media).

Category	Spot collection (µg/mg creatinine)	24-h collection (mg/24 h)	Timed collection (µg/min)
Normal	<30	<30	<20
Microalbuminuria	30–299	30–299	20–199
Clinical albuminuria	≥300	≥300	≥200

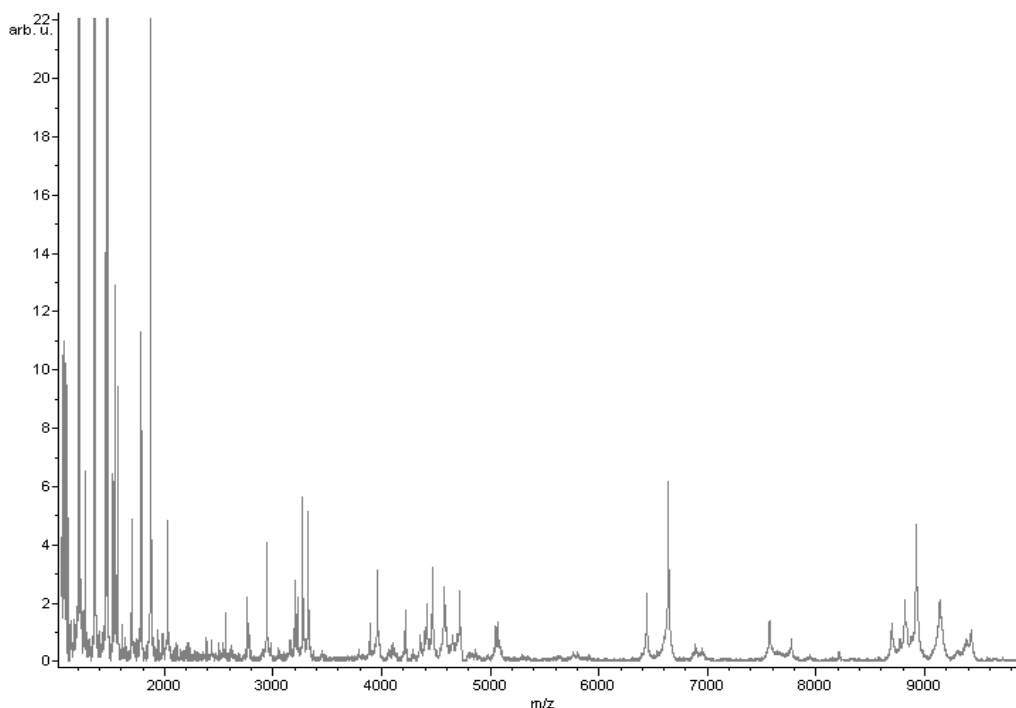
**Tabella 27.** Valori di escrezione urinaria dell'albumina (*albumin excretion rate, AER*)<sup>238</sup>.

Nessuna differenza significativa è stata osservata tra i pazienti e controlli per età, indice di massa corporea, valori di pressione sistolica e diastolica ed emoglobina glicata (HbA1c).

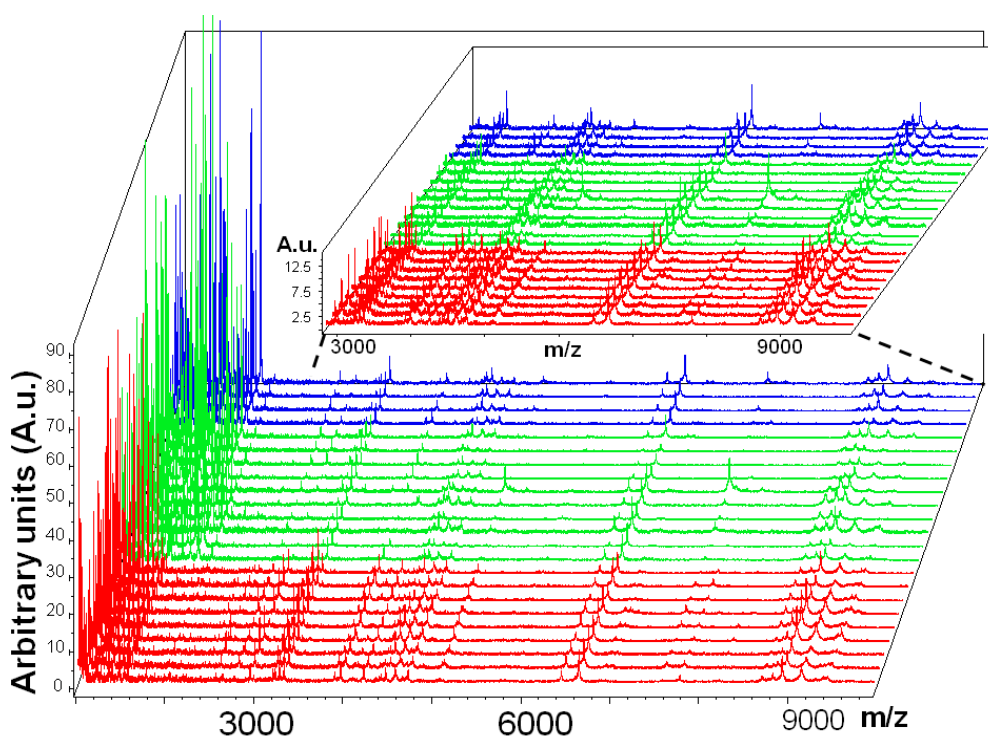
#### 4.2.1.2 *Analisi dei campioni ed elaborazione statistica dei profili proteici*

Il prefrazionamento del proteoma sierico, prima dell'analisi in MS, è stato eseguito mediante estrazione in fase solida con biglie magnetiche a fase inversa di tipo C8 (HIC8-MB).

I profili spettrali dei campioni sono stati acquisiti con uno spettrometro di massa MALDI-TOF in modalità lineare positiva in un range di massa da 1 a 10 kDa (Figure 52-53). Grazie all'automazione della metodica di purificazione e alla messa a punto dei parametri di acquisizione dello spettrometro, è stato possibile ottenere profili abbastanza omogenei all'interno delle classi studiate e ricchi di segnali. Inoltre è stato osservato un buon livello di riproducibilità degli spettri, nei dati ottenuti dall'analisi in doppio e dalla procedura di deposito su target metallico in quadruplicato di ciascun campione.



**Figura 52.** Profilo spettrale medio dei campioni di siero purificati con biglie magnetiche C8.



**Figura 53.** Visualizzazione 3D (*Stack View*) degli spettri di massa dell'intera casistica studiata (rosso = 9 controlli, verde = 10 T1D e blu = 4 T1DN) allineati dal software ClinProTools™. I profili sono stati ottenuti da analisi in MALDI-TOF dopo prefrazionamento dei campioni con biglie magnetiche C8. È mostrato lo spettro che risulta più simile alla media complessiva degli otto replicati di ciascun campione. L'asse x riporta i valori di  $m/z$ , l'asse y le intensità dei picchi in unità arbitrarie e l'asse z l'ordine di caricamento delle classi.

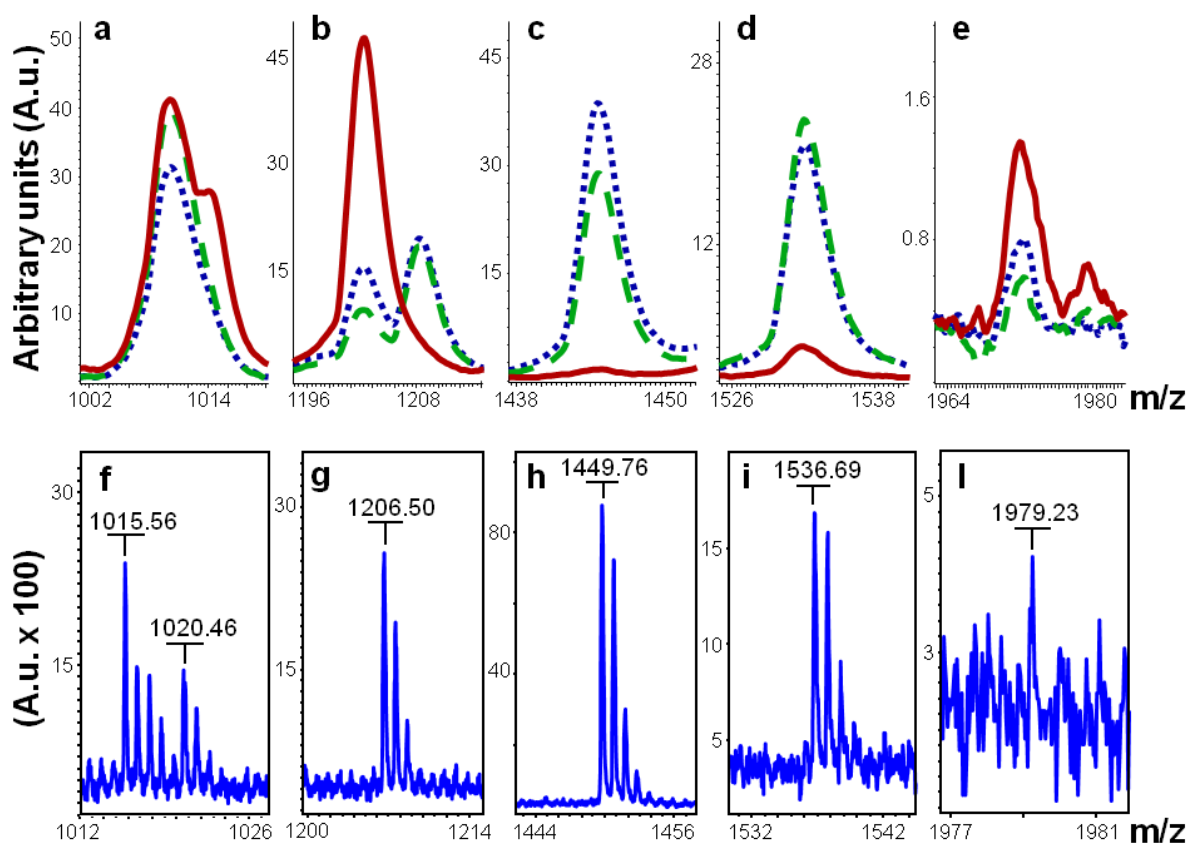
L'elaborazione degli spettri acquisiti e l'analisi dei pattern proteici è stata eseguita con il programma statistico ClinProTools™. Si è osservato che la modifica di alcuni parametri, sia nel pre-processamento degli spettri (soglia segnale rumore, smoothing e sottrazione della linea di base) che nell'utilizzo degli algoritmi di analisi multivariata, influenzava significativamente l'individuazione del pattern di segnali discriminanti. Sono stati quindi impostati dei valori che ottimizzassero il numero di picchi calcolati, purché mantenessero un'adeguata risoluzione e intensità. Questo ha consentito di evidenziare numerosi peptidi con intensità statisticamente diversa ( $p < 0,05$  con analisi della varianza ad una via, *one-way analysis of variance* ANOVA) nelle popolazioni in esame; in media circa 110 segnali comuni nei tre gruppi sono stati rilevati in questo range di massa e di questi circa 65 ioni sono risultati diversamente espressi in modo significativo.

Data la notevole complessità dei profili spettrali, è stato utilizzato l'*algoritmo genetico* (GA) per selezionare la migliore combinazione di picchi statisticamente significativi in grado di separare le classi in studio. È stato così individuato un pattern di cinque

segnali statisticamente differenti (Tabella 28), le cui regioni spettrali corrispondenti, da acquisizione in MALDI-TOF sia in modalità lineare che reflectron, sono riportate in Figura 54. Quattro di questi picchi presentavano una forma simmetrica. Il segnale a  $m/z$  1013, invece, evidenziava una “spalla” sul lato destro del picco, non risolta rispetto al principale a causa della bassa risoluzione dell’analisi MALDI-TOF in modalità lineare ed esclusivamente presente nel siero dei soggetti controllo; infatti, mediante acquisizione in alta risoluzione (modalità reflectron) è stato possibile risolvere due ioni la cui masse accurate sono  $m/z$  1015,56 e 1020,46. L’espressione degli ioni a  $m/z$  1445 e 1532 risultava sovraespressa nei pazienti rispetto agli individui sani, mentre gli altri picchi del cluster mostravano una sottoespressione.

Mass	PTTA <sup>a</sup>	PWKW <sup>b</sup>	Ave1 <sup>c</sup>	Ave2 <sup>d</sup>	Ave3 <sup>e</sup>	StdD1 <sup>f</sup>	StdD2 <sup>g</sup>	StdD3 <sup>h</sup>
1201,29	0,000717	0,00228	193,89	57,16	73,42	33,16	23,29	32,57
1972,12	0,00184	0,00228	12,73	6,46	9,31	2,16	1,6	1,27
1445,21	0,00219	0,009	20,84	128,82	194,42	4,24	83,64	45,1
1013,47	0,0104	0,0052	104,09	65,41	52,9	22,26	18,54	19,49
1532,07	0,0718	0,016	27,32	117,04	110,24	4,31	109,05	71,45

**Tabella 28.** Analisi statistica fornita dal software ClinProTools relativamente ai picchi utilizzati nel modello diagnostico e differentemente espressi ( $p < 0,05$ ) tra controlli (classe = 1), pazienti T1D (classe = 2) e T1DN (classe = 3). a) p-value calcolato con un t-test o ANOVA; valori inferiori a 0,05 indicano una rilevanza statistica. b) p-value secondo il test Wilcoxon o test Kruskal Wallis; valori inferiori a 0,05 indicano una rilevanza statistica. c-d-e) Area media per ogni picco rispettivamente nei controlli, pazienti T1D e pazienti T1DN. f-g-h) Deviazione standard di ogni segnale rispettivamente nei controlli, pazienti T1D e pazienti T1DN.



**Figura 54.** Zoom sui range di massa dei cinque segnali inclusi nel cluster in grado di discriminare le tre popolazioni studiate (pannelli in alto = acquisizione a bassa risoluzione in MALDI-TOF modalità positiva lineare, pannelli in basso = acquisizione ad alta risoluzione in MALDI-TOF modalità positiva reflectron).

#### 4.2.1.3 Efficacia diagnostica del pattern

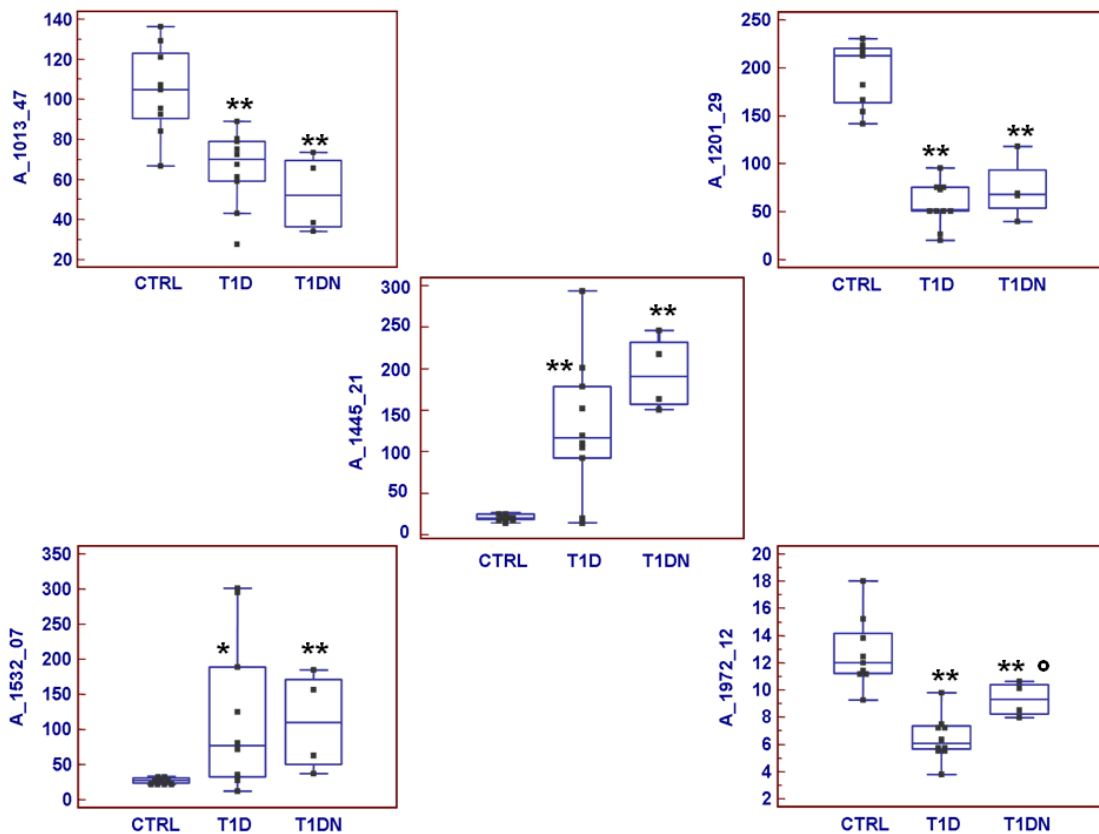
L'efficacia diagnostica di ciascun segnale è stata valutata, con il software MedCalc<sup>®</sup>, mediante analisi delle corrispettive curve ROC (*receiving operating characteristic curve*) e nella tabella 29 sono riportati i valori di AUC (*area under the curve*) calcolati.

<i>m/z</i>	Ctrl vs T1D	Ctrl vs T1DN	T1D vs T1DN
1013	0.922	0.972	0.700
1201	1.000	1.000	0.600
1445	0.833	1.000	0.775
1532	0.833	1.000	0.550
1972	0.989	0.944	0.950

**Tabella 29.** Valori AUC determinati mediante analisi delle curve ROC di ciascun segnale utilizzato nel cluster discriminante le tre popolazioni in studio.

Tutti i cinque segnali mostravano un'elevata accuratezza nel discriminare i soggetti sani dai pazienti diabetici con e senza danno renale (AUC 0,833-1 e 0,944-1, rispettivamente)<sup>234</sup>.

Inoltre, le aree di questi picchi negli spettri dei pazienti (T1D e T1DN) erano statisticamente differenti da quelle dei controlli (Figura 55). Solamente l'area del segnale a *m/z* 1972 risultava anche modificata in modo significativo nei pazienti diabetici con nefropatia rispetto ai T1D; questo ione infatti ha consentito di distinguere i due gruppi di soggetti malati con un valore di separazione AUC uguale a 0,950 (Tabella 29).



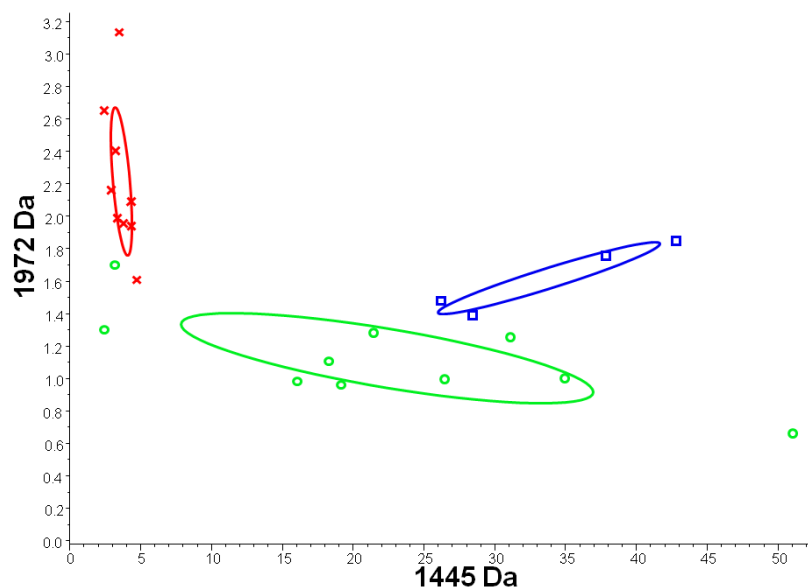
**Figura 55.** Grafici “box and whiskers” calcolati, per le tre popolazioni in esame, dalle aree dei cinque segnali utilizzati nel cluster. \*  $p < 0,05$  rispetto ai controlli. \*\*  $p < 0,01$  rispetto ai controlli. °  $p < 0,05$  rispetto ai pazienti T1D.

Nella tabella 30 sono indicati i valori di *cut-off* ( $p < 0,001$ ) e le corrispettive percentuali di specificità e sensibilità, calcolati per ciascuno degli ioni selezionati nel cluster relativamente alla loro maggior capacità discriminante. Questi dati sono stati ottenuti sempre con l'ausilio del software statistico MedCalc®.

<i>m/z</i>	Ctrl vs T1D	Ctrl vs T1DN	T1D vs T1DN
1013	80.3 (90 - 89)	73.4 (100 - 89)	38.4 (50 - 90)*
1201	95.3 (100 - 100)	118 (100 - 100)	51.8 (75 - 60)*
1445	27.1 (80 - 100)	27.1 (100 - 100)	124 (100 - 60)*
1532	33.4 (70 - 100)	33.4 (100 - 100)	35.4 (100 - 40)*
1972	7.5 (90 - 100)	10.6 (100 - 89)	7.5 (100 - 90)

**Tabella 30.** Valori di cut-off ( $p < 0,001$ ) indicativi del maggior grado di accuratezza e le corrispettive percentuali di specificità e sensibilità calcolate per ciascun ione selezionato (% sensibilità - % specificità). \* ns (non significativo statisticamente).

L'utilizzo contemporaneo di tutti e cinque i potenziali marcatori ha permesso di aumentare e consolidare l'efficacia diagnostica, raggiungendo una specificità del 100% e una sensibilità del 80% e 100% rispettivamente per i pazienti T1D e T1DN. Tuttavia, è importante osservare che è stato possibile discriminare le classi in esame anche utilizzando esclusivamente due ioni tra quelli inclusi nel modello ( $m/z$  1972 e 1445) (Figura 56). Ovviamente, l'uso combinato di tutti i segnali rafforza maggiormente il potere discriminante del cluster.



**Figura 56.** 2D Peak Distribution View mostra la distribuzione dei due ioni selezionati tra quelli inclusi nel modello diagnostico. L'area del picco e i valori  $m/z$  sono indicati sugli assi x e y. Tutti i segnali appartenenti alla stessa classe sono indicati con lo stesso simbolo e colore (x = controlli, o = T1D e □ = T1DN). Le ellissi indicano la deviazione standard delle aree/intensità dei picchi della media della classe.

#### 4.2.1.4 **Stima della dimensione della casistica per una conferma del potere diagnostico del pattern**

Sulla base dei risultati ottenuti in questo studio pilota, è inoltre stata stimata la dimensione che la casistica deve avere perché la capacità diagnostica del cluster



risponda ai criteri sotto riportati (*false discovery rate* FDR < 0,03). Il calcolo è stato eseguito, in accordo con un lavoro recentemente pubblicato da Cairns e collaboratori<sup>239</sup>, per le classi di pazienti diabetici con e senza nefropatia. I risultati ottenuti, con l'assistenza del Dipartimento di Informatica Sistemistica e Comunicazione dell'Università Milano-Bicocca (Dr. Italo Zoppis, Prof. Giancarlo Mauri), sono riportati in Tabella 31. In tutte le elaborazioni è stato fissato un livello stringente di significatività di 0,001 (*significance level*  $\alpha$ ) in modo da mantenere bassa la probabilità di ottenere falsi positivi, mentre il potere (sensibilità) del test utilizzato era uguale a  $1-\beta$  ( $\beta$  = *false negative rate*, FNR). Delta ( $\Delta$ ) indica, invece, la differenza delle medie delle aree/intensità dei picchi tra le classi di pazienti T1D e T1DN. Il calcolo della dimensione dei campioni richiede la stima di diverse componenti di varianza (media, 90° percentile e valore massimo); per ciascuna di queste è stato riportato il numero di campioni biologici necessari per ciascuna popolazione. Nei seguenti calcoli è stato considerato un numero di replicati tecnici uguale a 2.

#### A

$\Delta$	$1-\beta$	Variance		
		Median	90 <sup>th</sup> percentile	Maximum
$\log_2(1.25)$	0.95	241	313	314
	0.80	170	220	221
$\log_2(1.50)$	0.95	74	95	96
	0.80	52	67	67
$\log_2(2.00)$	0.95	26	33	33
	0.80	18	23	23

#### B

$\Delta$	$1-\beta$	Variance		
		Median	90 <sup>th</sup> percentile	Maximum
$\log_2(1.25)$	0.95	81	152	185
	0.80	57	107	130
$\log_2(1.50)$	0.95	25	46	57
	0.80	18	33	40
$\log_2(2.00)$	0.95	9	16	20
	0.80	6	11	14

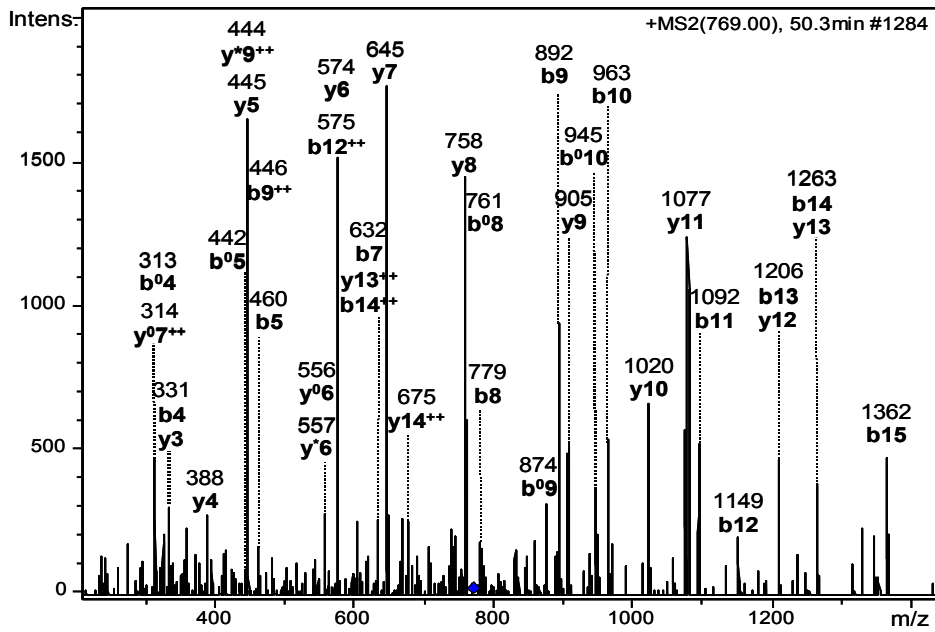
**Tabella 31.** Numerosità della casistica di pazienti diabetici con e senza nefropatia calcolata sulla base della varianza stimata per tutti i segnali nel range di  $m/z$  studiato (A) e per il picco a  $m/z$  1972 (B).

La dimensione dei gruppi variava da un massimo di più di 300 campioni biologici, se si utilizza la varianza più elevata (componente massimo della varianza) e si assume un rapporto di segnale di 1,25, a 26 campioni con la maggiore differenza delle aree/intensità dei picchi (2,00) e il valore medio delle componenti di varianza (Tabella 31A). Al contrario, il calcolo ristretto al segnale a  $m/z$  1972, che era in grado di discriminare le tre popolazioni, ha suggerito la necessità di una casistica più ridotta (Tabella 31B). La componente di varianza derivante dai replicati tecnici era 70% più bassa di quella ottenuta dalla varianza biologica; di conseguenza la numerosità dei campioni non varia in modo significativo quando si utilizza un numero di replicati maggiore di 2.

#### **4.2.1.5 Identificazione dei potenziali biomarcatori**

L'identificazione dei segnali differentemente espressi nelle classi in studio, e che quindi rappresentano candidati biomarcatori, è stata eseguita mediante analisi LC-ESI-MS/MS. Le masse accurate dei segnali (Figura 54) sono state utilizzate per identificare i corrispettivi picchi cromatografici. Solamente tre picchi del modello diagnostico sono stati identificati sulla base degli spettri MS/MS dei loro corrispettivi ioni doppia carica con  $m/z$  510, 604 e 769 (Figura 57). Le liste di masse ottenute dai cromatogrammi di questi ioni sono state sottoposte a ricerca in database con il server Mascot e l'identificazione è stata accettata solamente nel caso in cui gli spettri MS/MS avevano uno score significativo oltre la soglia di identità o omologia ( $p < 0,05$ ).

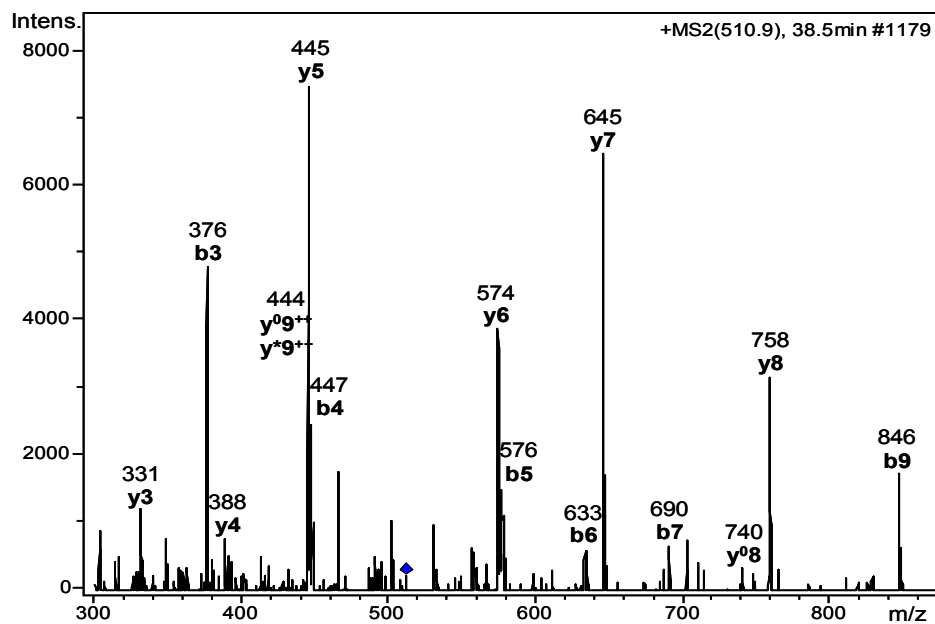
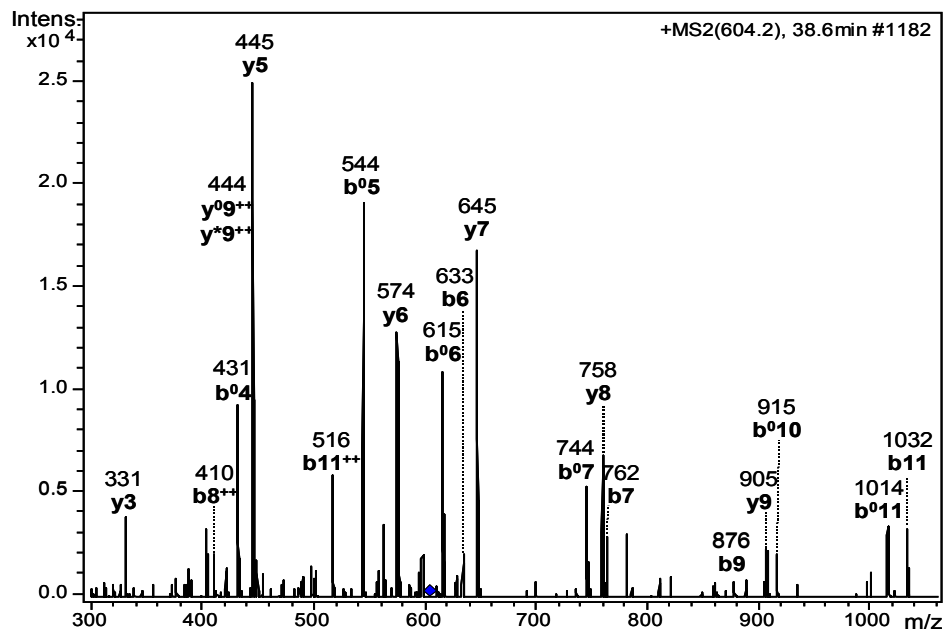
Il segnale a  $m/z$  1532 ( $m/z$  1536,69 in reflectron) è stato identificato come fibrinopeptide A intatto con sequenza aminoacidica **ADSGEGDFLAEGGGVR**. I picchi a  $m/z$  1201 ( $m/z$  1206,50 in reflectron) e a  $m/z$  1013 ( $m/z$  1020,46 in reflectron) sono stati identificati come frammenti del fibrinopeptide A con sequenza **EGDFLAEGGGVR** e **DFLAEGGGVR**.



**Figura 57.** Spettri MS/MS dei peptidi identificati ottenuti selezionando come ioni precursori i loro corrispettivi ioni doppia carica.

\* Ioni-NH<sub>3</sub> (-17 Da)

° Ioni-H<sub>2</sub>O (-18 Da)



## CAPITOLO 5

### DISCUSSIONE

Negli ultimi anni ha assunto sempre più importanza, ai fini diagnostici, lo studio dei profili proteomici, che presenta numerosi vantaggi rispetto all'analisi del trascrittoma poiché l'espressione genetica non sempre è correlata con l'assetto proteico funzionale e quantitativo; quest'ultimo è infatti regolato sia da eventi post-traduzionali quali glicosilazioni, fosforilazioni e solfatazioni, sia da fattori ambientali. La proteomica clinica, quindi, rappresenta un utile strumento al fine di comprendere i meccanismi fisiopatologici della malattia, identificare biomarcatori per una diagnosi precoce della malattia oppure eventuali bersagli di nuove molecole ad attività farmacologia.

Le tecniche utilizzate per lo studio del proteoma hanno subito negli anni recenti un notevole impulso, che ha condotto ad un significativo miglioramento della capacità risolutiva dei metodi analitici e ad uno sviluppo di sofisticati programmi bioinformatici per un aumento della specificità e selettività di analisi.

È ormai chiaro che un marker per la diagnosi iniziale o per lo screening di una malattia debba essere altamente specifico e sensibile. La sensibilità misura la proporzione di reali positivi che sono stati classificati correttamente come tali (*true positive fraction*, TPF); se l'obiettivo di un test è identificare le persone malate, la sensibilità è la capacità di rivelare correttamente la malattia in soggetti realmente affetti (proporzione delle persone con malattia che hanno un risultato positivo del test). La specificità, invece, è la percentuale di reali negativi che sono stati classificati correttamente come tali (*true negative fraction*, TNF); dunque in diagnostica con il termine di specificità si intende la capacità di un metodo di identificare correttamente i soggetti non affetti da malattia (proporzione delle persone non malate che hanno un risultato negativo del test). Dunque coloro che presentano valori alterati del marcatore in assenza di patologia, sono indicati come *falsi positivi*; se più del 50% della popolazione risulta come falso positivo, non è affidabile l'utilizzo del marcatore in questo tipo di indagine. I *falsi negativi*, invece, sono i pazienti non identificati come tali dal dosaggio. In generale un test diagnostico dovrebbe avere una sensibilità di almeno 75% per essere accettabile, mentre la specificità dovrebbe essere pressoché assoluta.

È importante inoltre sottolineare che l'uso di singoli biomarcatori per la diagnosi di una malattia non è risolutivo, in quanto molte patologie sono di origine poligenica; quindi la predittività di metodi diagnostici basati sul dosaggio di marcatori multipli risulta più affidabile soprattutto quando si voglia utilizzarli per la diagnosi precoce.

Tra le numerose patologie che sono attualmente allo studio in campo proteomico vi sono le malattie che colpiscono i reni. Nelle malattie rene-relative, i fluidi biologici (urine e siero) rappresentano una fonte potenziale di biomarcatori; l'identificazione dei polipeptidi urinari e sierici consente di diagnosticare la severità della patologia molto tempo prima della comparsa dei sintomi.

A tal proposito, questo lavoro di ricerca mira a studiare il proteoma di fluidi biologici umani di soggetti sani e di pazienti con patologie renali tumorali e non tumorali: il tumore renale a cellule chiare (Renal cell Carcinoma, RCC) e la nefropatia diabetica. L'obiettivo è stato quello di costruire i profili proteomici differenziali di fluidi biologici di controlli e di pazienti con RCC, con patologie renali non-RCC, con diabete e nefropatia diabetica mediante tecnica di estrazione in fase solida associata alla spettrometria di massa. L'applicazione di questa tecnologia avanzata, che impiega biglie magnetiche attivate con opportune fasi per l'estrazione da fluidi biologici di proteine/peptidi, consente di valutare il proteoma al fine di identificare marcatori predittivi del RCC e della nefropatia diabetica.

## **5.1 IL CARCINOMA RENALE**

Il carcinoma a cellule renali (RCC) costituisce il 3% delle neoplasie maligne più comuni che insorgono nell'età adulta e l'80-90% dei tumori renali primari. Il tasso di incidenza mondiale è cresciuto rapidamente negli ultimi anni; infatti, a differenza di altri tumori urologici, il carcinoma renale ha un maggior potenziale metastatico ed è sia chemio che radioresistente. Questo è il motivo per cui il principale approccio clinico terapeutico per i pazienti con tale tumore consiste nella resezione chirurgica totale o parziale (per masse tumorali di piccole dimensioni). Inoltre è ben noto ormai in letteratura che la diagnosi del ccRCC è associata ad una prognosi meno favorevole rispetto alle altre forme istologiche, infatti i sintomi diventano evidenti ad uno stadio piuttosto tardivo della malattia.

Dunque, numerosi sforzi sono stati compiuti nel campo della ricerca al fine di sviluppare nuove metodiche adeguate per una diagnosi precoce del RCC o per un suo monitoraggio continuo. Tuttavia ad oggi non sono stati individuati biomarcatori specifici, che permettano attraverso l'analisi di fluidi biologici il riconoscimento di

questa patologia né in stadio precoce né già avanzato. Per molti anni a riguardo sono state impiegate tecniche di proteomica classica, che consistono nell'estrazione proteica da tessuti renali normali e tumorali, seguita da separazione in elettroforesi bidimensionale ed identificazione con spettrometria di massa delle proteine differenzialmente espresse<sup>240</sup>. L'elettroforesi bidimensionale risulta però una tecnica lunga e laboriosa, quindi difficilmente applicabile per uno screening diagnostico della popolazione; inoltre consente facilmente di rilevare proteine intatte e loro frammenti oltre 10 kDa, ma presenta forti limitazioni per proteine/peptidi al di sotto di questa soglia<sup>241</sup>. La maggior parte delle variazioni rilevate nel proteoma del tessuto ccRCC<sup>242-244</sup> corrisponde a proteine sottoesprese rispetto al tessuto sano; questo riduce la loro importanza come potenziali biomarcatori. In ogni caso, sono state riportate in letteratura anche alcune biomolecole sovraesprese nel tessuto tumorale, ma nessuna di queste è stata ancora sperimentata e validata come marcatore diagnostico, sia singolarmente che in associazione ad altre<sup>242</sup>.

Pertanto oggi l'interesse scientifico è rivolto all'utilizzo di tecniche di profiling altamente sensibili e versatili, basate su processi cromatografici di purificazione prima dell'analisi in MS; inoltre la ricerca diretta in fluidi periferici di proteine, la cui espressione risulta alterata per una determinata malattia, rappresenta un valido approccio. Tra queste metodiche innovative vi è una tecnica nota come *surface-enhanced laser desorption ionization* (SELDI) che si basa sulla combinazione di un sistema di prefrazionamento del campione tramite superfici funzionalizzate (ProteinChip) con l'analisi MALDI-TOF<sup>179</sup>. Inizialmente tale tecnica è stata applicata allo studio del carcinoma renale su campioni di tessuto. In uno studio di von Eggeling e collaboratori<sup>245</sup>, sono stati analizzati tessuti renali normali e tumorali oltre che quattro casi di neoplasia intraepiteliale cervicale e tre casi di carcinoma della cervice uterina; sono stati così identificati pattern di proteine differenzialmente espresse nelle varie popolazioni la cui espressione sembra correlata allo sviluppo e alla progressione del tumore. In studi successivi la tecnica SELDI è stata anche applicata per l'analisi di campioni di urine raccolte da pazienti con carcinoma renale. In un lavoro pubblicato da Rogers e collaboratori, sono state analizzate le urine di soggetti controllo, pazienti affetti da RCC e pazienti con tumori benigni del rene e infezioni del tratto urinario<sup>246</sup>; dall'analisi delle urine da 48 pazienti ccRCC, 38 volontari sani e 20 pazienti con malattia benigna del tratto urogenitale, gli autori hanno elaborato un modello diagnostico con sensibilità e specificità rispettivamente del 98% e del 100%. Tuttavia la validazione di tale cluster, a distanza di 10 mesi, con un gruppo di 80

campioni analizzati in cieco (36 RCC, 31 controlli e 13 pazienti con affezioni urologiche benigne) ha evidenziato un declino dei valori di sensibilità e specificità in un range 41%-77%. In aggiunta, in numerosi lavori presenti in letteratura il carcinoma renale è stato indagato su campioni di siero mediante sempre tecnologia SELDI. In uno studio di Hara e collaboratori <sup>247</sup>, i dati ottenuti dall'analisi di campioni di 21 pazienti ccRCC e 24 volontari sani, ha permesso nella *fase di training* di identificare due peptidi la cui espressione risultava aumentata nei soggetti malati; l'utilizzo combinato di questi potenziali marcatori ha mostrato una sensibilità e specificità rispettivamente del 90,5% e 91,7%. La validazione esterna di tale modello mediante utilizzo di differenti campioni (19 ccRCC e 20 controlli) ha confermato la sua efficacia diagnostica con una sensibilità di 89,5% e specificità di 95%. Sebbene questa tecnica sia stata ampiamente applicata in campo proteomico da molti gruppi di ricerca, al fine di identificare possibili biomarcatori correlati a diverse patologie, la riproducibilità e la sensibilità/specificità dell'approccio SELDI sono da lungo tempo oggetto di dibattito <sup>248</sup>.

Una valida alternativa a tale metodica consiste nell'arricchimento e nel frazionamento *off-line* attraverso l'uso di microsfere magnetiche con superfici funzionalizzate prima dell'analisi in MALDI-TOF del proteoma presente nei fluidi biologici <sup>195</sup>; l'utilizzo di tale tecnica è stato riportato con successo in numerosi studi di profiling <sup>155,193,194,249</sup>. Nel lavoro precedentemente pubblicato su campioni di urine da pazienti RCC <sup>233</sup>, l'applicazione della tecnologia ClinProt ha permesso di ottenere profili proteici caratterizzanti lo stato tumorale e di selezionare tre peptidi con elevata specificità (100%) e sensibilità (95%) diagnostica. Per uno di questi peptidi l'identificazione mediante LC-ESI-MS/MS ha indicato la struttura di un frammento della glicoproteina uromodulina.

I patterns che sono stati identificati in questo progetto di ricerca mediante analisi di campioni di urine da pazienti ccRCC, mostrano una buona capacità diagnostica, sia nella validazione interna che nella fase di validazione esterna.

Nella caratterizzazione del proteoma urinario con biglie magnetiche a fase inversa (HIC8), l'ampliamento della casistica ha permesso di verificare il cluster precedentemente pubblicato e di proporre nuovi modelli più robusti; quest'ultimi presentano elevati indici di performance, sino al raggiungimento di una sensibilità e specificità del 92%. Questi valori sono stati confermati ulteriormente mediante validazione con i campioni di urine analizzati negli anni precedenti (specificità = 90% e sensibilità = 88%). Se l'utilizzo di un maggior numero di pazienti consentirà di

rafforzare ancor di più efficacia diagnostica di tali modelli, una fase successiva di analisi sarà sicuramente quella di identificare questi potenziali biomarcatori al fine di comprendere meglio i meccanismi patologici alla base del tumore. Ulteriori esperimenti sono in fase di progettazione per la valutazione della capacità discriminatoria dei modelli sulla base dello stadio tumorale e della loro specificità nella diagnosi precoce di altri sottotipi di tumore renale maligno e neoplasie benigne. Risultati promettenti sono stati ottenuti anche dall'analisi del proteoma con microsfere magnetiche a debole scambio cationico (WCX); l'analisi statistica dei profili proteici ha fornito numerosi segnali differenzialmente espressi in modo significativo nei pazienti RCC e non-RCC rispetto ai soggetti sani. I peptidi estratti mostrano un forte capacità diagnostica nel distinguere i pazienti RCC dai controlli; inoltre, ancor più interessante in questo studio è la possibilità di utilizzare tali modelli per distinguere i pazienti RCC dai non-RCC, mediante applicazione di un processo decisionale a sequenza. L'incremento della casistica di pazienti con neoplasie benigne del rene e altri sottotipi di tumore renale maligno (non-RCC) consentirà di validare i modelli proposti e se confermati nella loro efficacia predittiva potranno fornire le basi per un valido test diagnostico con basse percentuali di falsi positivi.

Dallo studio di campioni di siero raccolti da pazienti ccRCC, effettuato in questo progetto di ricerca, è stato identificato un cluster di tre segnali; la valutazione preliminare (*training data*) dell'efficacia diagnostica ha mostrato risultati incoraggianti (specificità = 100% e sensibilità = 90%). Il modello ha anche riportato elevati valori di specificità e sensibilità nella validazione esterna con sieri raccolti da una differente casistica (*test data*). In aggiunta l'analisi di *cross validation*, eseguita al fine di testare l'indice predittivo del modello per future classificazioni, ha condotto a risultati molto simili ai dati preliminari con sensibilità e specificità dell'88% e 96% rispettivamente. I dati ottenuti indicano inoltre un andamento dei livelli di espressione dei peptidi coerenti con una stratificazione dei pazienti RCC in base al grado tumorale; infatti hanno evidenziato una significativa sensibilità (100%) nel riconoscere i pazienti al secondo e terzo stadio, associata ad un aumento di intensità del picco a  $m/z$  1445 e una riduzione dei picchi a  $m/z$  1083-6879, rispetto a quella dei pazienti al pT1.

Il modello individuato, in grado di distinguere i pazienti con tumore dai soggetti sani, rappresenta un promettente metodo diagnostico per il carcinoma renale, che risulta indipendente dalla conoscenza aminoacidica dei peptidi di riferimento.



Pertanto i risultati raggiunti in questo lavoro sul carcinoma renale suggeriscono come un approccio proteomico basato sull'utilizzo di biglie magnetiche rappresenti un valido mezzo per la ricerca di potenziali biomarcatori clinici.

## **5.2 LA NEFROPATIA DIABETICA**

La nefropatia diabetica (ND) è la causa principale di insufficienza renale cronica e una delle cause principali di morbilità e mortalità correlate al diabete mellito (DM). Tra le numerose patologie che sono attualmente allo studio con l'uso della proteomica si ritrova il diabete mellito insulino dipendente (IDDM), definito anche diabete di tipo I (T1D), che è una malattia cronica, su base autoimmunitaria, caratterizzata da una scarsa o assente capacità delle cellule beta del pancreas di produrre insulina, conseguente alla loro progressiva distruzione. Una delle complicanze più gravi è rappresentata dallo sviluppo di nefropatia, che può avere un decorso ingravescente fino a portare all'insufficienza renale terminale, che necessita di trattamento dialitico sostitutivo o trapianto renale. La ND rappresenta una malattia in costante crescita, dato l'altissimo tasso di incidenza a livello mondiale della malattia diabetica.

A tal proposito, negli ultimi decenni, la ricerca si è focalizzata sullo studio dei meccanismi fisiopatologici e molecolari del diabete di tipo 1 e sulla possibilità di individuare biomarcatori selettivi e specifici per la nefropatia diabetica. Attualmente non vi sono biomarcatori adeguati per una diagnosi precoce della predisposizione dei soggetti diabetici allo sviluppo di tale complicanza.

Numerosi studi sono stati riportati in letteratura relativamente alla ricerca di marcatori diagnostici e prognostici nei pazienti affetti da diabete mellito. La tecnica di elettroforesi capillare accoppiata alla spettrometria di massa (CE-MS) è stata con successo impiegata al fine di individuare cluster di peptidi differenzialmente espressi in urine di 112 pazienti con diabete mellito di tipo 2 (T2D) rispetto a 39 soggetti sani<sup>250</sup>. Inoltre sono stati osservati diversi pattern di peptidi con espressione variata nei pazienti con e senza albuminuria, suggerendo una potenziale capacità diagnostica nel predire lo sviluppo del danno renale dovuto a diabete mellito. Alterazioni del profilo proteico urinario sono state evidenziate anche mediante elettroforesi bidimensionale in 10 pazienti T2D normoalbuminurici e 12 pazienti T2D con nefropatia (T2DN)<sup>251</sup>; in questo lavoro sono state identificate undici proteine differenzialmente espresse. Molti altri studi sono stati condotti su campioni di urine da pazienti diabetici di tipo 2 con e senza nefropatia<sup>105,252,253</sup>. Al contrario, meno ricerca è stata finora eseguita su campioni di siero, probabilmente a causa della maggior

difficoltà nella raccolta e preparazione di questa tipologia di fluido<sup>254,255</sup>. In un lavoro di Sundsten e collaboratori, sono state individuate mediante SELDI-TOF MS dieci proteine sovraesprese e cinque sottoesprese nel siero di pazienti T2D rispetto ai soggetti controllo<sup>256</sup>; tra queste proteine, sono state identificate nel primo gruppo l'apolipoproteina C3 (9,4 kDa) e la transtiretina (13,9 kDa), mentre nel secondo gruppo erano presenti l'albumina (66 kDa) e la transferrina (79 kDa).

In ogni caso, pochissimi studi sono riportati in letteratura su pazienti diabetici di tipo 1 (T1D) mirati a caratterizzare potenziali biomarcatori per una diagnosi precoce. Meier e collaboratori<sup>257</sup> hanno indagato il proteoma urinario di 44 adolescenti T1D e 9 soggetti sani mediante CE-MS; è stato determinato un cluster di 88 polipeptidi differenzialmente espressi negli adolescenti con nefropatia (microalbuminuria) rispetto ai pazienti diabetici normoalbuminurici, ma nessuna informazione strutturale di questi segnali è stata fornita. Sempre lo stesso gruppo di ricerca, recentemente, utilizzando lo stesso approccio analitico (combinazione *online* di CE ed ESI-MS) e ha mostrato un pattern di 15 proteine con espressione alterata nelle urine di pazienti affetti da malattia coronaria, T1D e nefropatia<sup>258</sup>; in questo cluster erano presenti frammenti di collagene  $\alpha$ -1 (I) e (III). Anche la tecnologia SELDI-TOF è stata applicata con successo in uno studio solo preliminare su campioni di siero da pazienti T1D<sup>259</sup>, sono state individuate numerose differenze ma nessun dato relativo alla struttura del modello è stata fornita.

Cairns e collaboratori, in un recente lavoro<sup>239</sup>, hanno inoltre dimostrato che studi di proteomica clinica possono comunque essere utili anche se condotti su una casistica di piccole dimensioni (ad esempio per eseguire studi pilota); infatti non solo è possibile rilevare segnali peptidici con differente intensità nelle popolazioni in esame, stimolando quindi ad un proseguimento delle analisi, ma anche stimare dalle componenti di varianza la dimensione che la casistica deve avere affinché si abbia una conferma della significatività del modello diagnostico.

Nello studio di questo progetto di ricerca, eseguito mediante tecnologia ClinProt-MALDI-TOF su campioni di siero di pazienti T1D con e senza nefropatia e soggetti sani, sono stati individuati cinque segnali differenzialmente espressi in modo significativo nelle tre popolazioni. Ciascun picco mostrava un'elevata accuratezza nel discriminare i pazienti T1D dai controlli (valore AUC tra 0,833 e 1) ed inoltre le aree di questi picchi negli spettri di tutti i pazienti (T1D e T1DN) erano statisticamente differenti da quelle dei soggetti sani. In aggiunta, il segnale a  $m/z$  1972, con espressione più elevata nei pazienti T1DN rispetto ai T1D, era in grado di distinguere

i due gruppi di soggetti malati con un valore AUC uguale a 0,950; l'utilizzo di questo picco in combinazione con il segnale a  $m/z$  1445 permette di discriminare le tre classi in esame. Tre peptidi del cluster sono stati identificati sulla base degli spettri MS/MS dei loro corrispettivi ioni doppia carica; Gli ioni a  $m/z$  1206,50 e 1020,46 sono stati identificati come frammenti del fibrinopeptide A (FPA) ( $m/z$  1536,69), che deriva dalla degradazione del fibrinogeno a fibrina rilasciando fibrinopeptide A e B.

Il fibrinopeptide A costituisce il frammento peptidico della catena  $\alpha$  del fibrinogeno ed è un indice fedele dello stato "attuale" di attivazione del sistema coagulativo, poiché presenta un'emivita plasmatica molto breve (circa 3-5 minuti)<sup>260</sup>. Il fibrinopeptide A intatto ha una sequenza aminoacidica di 16 aa, ADSGEGDFLAEGGGVR<sup>248</sup>.

La protrombina viene attivata mediante taglio proteolitico sottoforma di trombina. Quest'ultima catalizza il taglio selettivo dei legami Arg-Gly del fibrinogeno per formare la fibrina e rilasciare i fibrinopeptidi A (sito di clivaggio Arg<sup>16</sup>-Gly<sup>17</sup>) e B (sito di clivaggio Arg<sup>14</sup>-Gly<sup>15</sup>). La fibrina monomerica polimerizza a formare fibrina insolubile e stabile sotto l'azione del Fattore XII<sup>261,262</sup>.

Il dosaggio dei fibrinopeptidi è utile generalmente per la valutazione della velocità di attivazione del fibrinogeno, che è normalmente prodotto dagli epatociti ed è presente in circolazione ad una concentrazione di circa 9  $\mu$ M con un'emivita plasmatica di 100 ore<sup>248</sup>. Il fibrinopeptide A rappresenta, quindi, un marker biologico di ipercoagulabilità (dovuta ad un aumento del fibrinogeno), i cui livelli comunque diminuiscono in caso di trattamento eparinico<sup>263</sup>. I livelli normali di fibrinopeptide A rientrano in un range che va da 0,6 a 1,9 ng/mL<sup>260</sup>. Livelli aumentati di questo polipeptide, invece, sono correlati alla presenza di patologie cardiovascolari e, in particolare, sono indicativi di un aumentato rischio di eventi coronarici; infatti il fibrinopeptide A svolge la sua funzione come agente mitogeno sulle cellule endoteliali, muscolari lisce e sui fibroblasti<sup>261,264</sup>. Il fibrinopeptide A è considerato un potenziale indicatore dei principali tumori maligni, quali epatocarcinoma, cancro ovarico e cancro uroteliale<sup>265,266</sup>. È stato anche dimostrato che il controllo glicemico correla con i livelli di fibrinogeno e con i livelli di fibrinopeptide A plasmatico e urinario: la concentrazione plasmatica e urinaria di FPA correla con la durata del DM di tipo 1 e i soggetti affetti da questa forma di diabete con complicazioni vascolari e iperglicemia presentano livelli aumentati di FPA nel plasma e un aumento della velocità di lisi del fibrinogeno<sup>267</sup>. Dunque, l'iperglicemia influenza direttamente i livelli di FPA nel plasma e nelle urine e stimola fortemente l'attivazione della trombina<sup>268</sup>.

Un'alterazione dei livelli di espressione di frammenti della catena A-alfa del

fibrinogeno è già stata riportata in diverse patologie. Nomura e collaboratori<sup>269</sup> hanno identificato un frammento della catena A-alfa del fibrinogeno, di circa 5,9 kDa, sottoespresso nel siero di pazienti alcolizzati e i cui livelli aumentavano dopo un periodo di astinenza; gli autori hanno descritto la struttura della isoforma 2 intatta, che differisce dalla sequenza canonica per la sostituzione della sequenza D<sub>631</sub>CDDVLQTHPSGTQ<sub>644</sub> con GIHTSPLGKPSLSP e la mancanza della sequenza da S<sub>645</sub> a Q<sub>866</sub>. In ogni caso, il frammento identificato (da S<sub>576</sub> a V<sub>629</sub>) è presente nella parte comune delle due isoforme del fibrinogeno intatto. Inoltre, nel 2006 Villanueva e collaboratori<sup>270</sup> hanno indagato l'effetto dell'attività di esoproteasi differientemente espresse sul proteoma sierico di varie tipologie tumorali; essi hanno descritto una sottoespressione di tutti questi tre peptidi nel siero di pazienti con cancro alla prostata, al seno e tumore della vescica. L'espressione del fibrinopeptide A intatto era totalmente soppressa nel tumore della vescica e ridotta di circa il 50% nei restanti tumori rispetto ai soggetti sani. I due frammenti, corrispondenti a quelli identificati in questo progetto di ricerca ( $m/z$  1206,50 e 1020,46), era invece diminuiti dal 31 al 72% in tutte le forme tumorali. Nel mio lavoro, allo stesso modo, i due frammenti di fibrinopeptide A erano sottoespressi nel siero dei pazienti con e senza nefropatia, mentre il FDA intatto risultava sovraespresso nei pazienti T1D.

Un aumento della fibrinolisi oltre che livelli aumentati di fibrinogeno nel plasma sono già stati ben descritti in pazienti con diabete mellito di tipo 2<sup>271,272</sup> e sono associati ad un aumentato rischio di sviluppare nefropatia diabetica<sup>273</sup>. Dati invece contrastanti sono riportati per il diabete mellito di tipo 1. Un aumento dei livelli di fibrinogeno sono stati osservati nello stadio precoce di sviluppo della nefropatia diabetica<sup>274</sup>, mentre l'attività fibrinolitica è stata trovata inalterata nei pazienti T1D rispetto ai soggetti sani<sup>275</sup>. Tuttavia, i dati ottenuti in questo lavoro di ricerca suggeriscono, in accordo con lo studio di Lengyel<sup>274</sup>, come elevati livelli di attività fibrinolitica siano correlati con la nefropatia nei pazienti affetti da diabete di tipo 1.

In aggiunta, frammenti del complemento C3 sono stati descritti differientemente espressi in numerose patologie<sup>276-278</sup>. In particolare, uno di questi frammenti a  $m/z$  1449,76, che possiede attività antinfiammatoria, è stato riscontrato sovraespresso nei tumori alla prostata, al seno e della vescica<sup>270</sup>; è quindi possibile ritenere con elevata confidenza che il segnale a  $m/z$  1445 (1449,76 in reflectron mode) trovato in questo progetto significativamente aumentato nei pazienti T1D e T1DN sia realmente il frammento sopra descritto.

In conclusione, i risultati di questo studio pilota mostrano come il proteoma sierico possa essere utile ai fini di una identificazione precoce dei soggetti diabetici a rischio di sviluppare malattia renale allo stadio terminale. I dati sperimentali sono incoraggianti e hanno inoltre permesso di stimare la numerosità che la futura casistica deve avere in modo da confermare la capacità diagnostica del modello e mantenere bassa la proporzione di falsi positivi.