

La meraviglia del laboratorio

M. TONUS

NNELLA SOSTANZA FEDELE AL MODELLO di ricercatore, Maria Grazia Daidone è però un esempio di come alcune qualità che mostra di possedere ^ intuizione, ragionevolezza, dedizione al lavoro, chiarezza di vedute, passione e fantasia ^ contrastino con l'idea che questa professione, per molti versi logorante, diventi routine o rincorsa a un risultato fine a se stesso, disgiunto dalla clinica. Viceversa, se a distanza di trent'anni, e con una punta di emozione, svela ancora con naturalezza che il ricercatore è "il lavoro più bello del mondo", non c'è dubbio che la scelta di dedicarsi all'attività di laboratorio è stata quella giusta.

Laureata in scienze biologiche all'Università degli Studi di Milano nel 1976, Maria Grazia Daidone è un'autorità riconosciuta in Italia e all'estero nell'ambito della medicina molecolare, carriera consacrata con la nomina, nel 2005, a direttore della Struttura complessa Ricerca traslazionale, presso il Dipartimento di Oncologia Sperimentale e Laboratori dell'Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori di Milano.

La cosa che non ti aspetti da un percorso coronato dal successo è un inizio, in piccola misura, col sapore del rimpianto.

"Francamente avrei voluto frequentare la facoltà di medicina ma per diversi motivi ho ripiegato su scienze biologiche con l'idea di diventare medico in un periodo successivo della mia vita" racconta la ricercatrice. "Perciò mi sono iscritta a biologia, a Milano. Al momento del tirocinio avrei potuto frequentare i laboratori dell'Università della mia facoltà, che però giudicavo avulsi da una realtà operativa, oppure rivolgermi a un centro più orientato alla cura dei malati e all'applicazione clinica delle scoperte".

L'attività applicata alla clinica

Alla fine degli anni Settanta, a Milano, i poli di ricerca emergenti erano due: l'Istituto Mario Negri e l'Istituto Nazionale dei Tumori. Quest'ultimo, in particolare, si stava delineando come un'entità estremamente vivace, giovane e in crescita anche a livello internazionale.

"In quel periodo mi capitava di sentire alla radio notizie a proposito di ricercatori italiani dell'Istituto che avevano messo a punto un trattamento chirurgico conservativo della mammella, con risultati comparabili all'intervento demolitivi, o una chemioterapia particolarmente efficace. Testimonianze concrete di un progetto all'avanguardia nella ricerca applicata sui pazienti, in sintonia con ciò che cercavo in quel momento. Perciò ho preso la mia decisione, ho girato l'angolo e sono entrata all'Istituto dei Tumori per chiedere una tesi sperimentale. Il direttore sanitario mi indirizzò alla professoressa Rosella Silvestrini che all'epoca dirigeva un piccolo laboratorio dedicato allo studio della cinetica cellulare, ossia all'attività proliferativa delle cellule e alla farmacocinetica clinica nei tumori. Fin da subito fui catapultata in un ambiente speciale e meraviglioso, sotto la guida di una ricercatrice molto affascinante e vivace dal punto di vista intellettuale. In laboratorio eravamo tutti giovani e tutti lavoravamo, nel senso più fedele del termine, sulla proliferazione dei tumori umani e sulla sensibilità in vitro ai farmaci e agli ormoni. Un'attività di ricerca fiorente, fortemente integrata in una struttura oncologica, direttamente a contatto con il tumore clinico e quindi con il paziente, con l'obiettivo di identificare i fattori di rischio per l'evoluzione della malattia che avrebbero potuto deporre per una cattiva o una buona prognosi. Allo stesso tempo, ci impegnavamo a trovare



una soluzione per i tumori più aggressivi nel tentativo di identificare i farmaci per i quali le cellule neoplastiche mostravano una maggiore sensibilità. Erano anni di frontiera, momenti in cui si iniziavano a studiare i tumori umani in laboratorio con l'idea, sempre ben presente, di trasferire i risultati nella pratica clinica”.

Nel 1976 Maria Grazia Daidone si laurea in Scienze Biologiche e si iscrive alla facoltà di Medicina. “In teoria conservavo il desiderio di diventare medico ma nella pratica l'ambiente in cui stavo lavorando era già estremamente appagante. Ero personalmente in contatto con l'équipe del professore Umberto Veronesi e di Gianni Bonadonna, figure storiche nell'ambito

della chirurgia e della terapia medica oncologica. In più in Istituto vigeva, e vige ancora, una sorta di par condicio: non c'era distinzione tra laureato donna o laureato uomo, tra medico e biologo. Era sufficiente proporre un'ipotesi di lavoro ragionevole e avere voglia di impegnarsi per ottenere spazio e gratificazione. La consapevolezza di svolgere un'attività con una ricaduta pratica ed effettiva sulla cura del paziente ha in qualche maniera sublimato, in senso positivo, l'esigenza di laurearmi in medicina. E non era affatto difficile trovare motivi di soddisfazione. Per esempio, lo studio sulla proliferazione e la chemiosensibilità dei tumori umani, svolto nel laboratorio della professoressa

Silvestrini, permise all'Istituto di essere uno dei primi centri in grado a mettere a punto alcuni trattamenti in base alla chemiosensibilità della neoplasia, in particolare del melanoma”.

Dopo la laurea, dal 1977 al 1980, Maria Grazia Daidone frequenta uno stage formativo in biologia cellulare nel laboratorio della professoressa Silvestrini, completato da un'esperienza analoga, di acquisizione di tecniche per lo studio della chemiosensibilità dei tumori umani in vitro, presso l'Health Science Center di Tucson, negli Stati Uniti.

“In laboratorio realizzavamo la determinazione dei recettori ormonali per il carcinoma della mammella, il primo marcatore biologico a essere inserito nella cartella clinica delle pazienti dell'Istituto fin dal 1978. Come informazione aggiuntiva per i clinici, includevamo anche il dato sul tasso di proliferazione del tumore. Questo significa che alla fine degli anni settanta facevamo determinazioni routinarie su ampie casistiche, su tutte le pazienti che passavano in camera operatoria, ovvero circa 1.000 interventi l'anno”.

L'attenzione per la qualità

Questo carico di lavoro notevole era accompagnato dall'esigenza, sempre in primo piano fin dagli albori della scoperta dei biomarcatori tumorali, di controllare la qualità delle informazioni inserite in cartella clinica.

“Confrontarci con la riproducibilità del dato è stata una grande scuola di vita” afferma la ricercatrice. “Eravamo consapevoli che il campione di tessuto tumorale sul quale si lavorava era unico e irripetibile, a differenza di una linea cellulare che, se l'esperimento fallisce, si può rifare da capo. Per questo motivo, il nostro protocollo prevedeva un controllo delle determina-

zioni in doppio e triplo cieco e il dato in cartella non era più modificabile. Il banco di prova sulla riproducibilità di un marcatore biologico era stato testato sulla nostra pelle, in Istituto, e ciò ha spinto il nostro gruppo a proporre e ad attivare controlli di qualità per la determinazione dei fattori biologici su scala nazionale. L'obiettivo era fornire ai clinici una rete di laboratori affidabili, presso i quali far determinare le variabili biologiche da trasferire al letto del paziente e su cui basare le decisioni terapeutiche. Acquisire sempre maggiore credibilità, e fornire solidità a un dato di laboratorio sono stati, per noi, passi davvero molto importanti così come formare un gruppo di lavoro attento alla metodologia e all'applicazione rigorosa di un processo”.

Sempre in quel periodo fu inaugurata, presso la facoltà di Medicina di Milano, una scuola di specializzazione statistica medica e biometria.

“Di fronte alla mole di informazioni sfornate quotidianamente dal laboratorio, diventava essenziale acquisire una coscienza di grado superiore rispetto alla valutazione dei dati sperimentali. Determinando le caratteristiche biologiche dei tumori su ampie casistiche, cercavano di correlare queste acquisizioni con il decorso clinico del paziente e, per farlo, avevamo bisogno di strumenti poco comuni a noi laboratoristi ma che col tempo sono diventati fondamentali nel controllo di qualità e nella riproducibilità dei dati. La necessità di avere una preparazione statistica è stata colmata iscrivendomi, nel 1997, a questa scuola di specialità. Non per sostituirmi agli statistici medici ma per usare un linguaggio comune e capire le esigenze reciproche” ricorda la ricercatrice.

La cura per la riproducibilità del dato ottenuto con tecniche complesse è sempre stata una priorità per la ricercatrice che, dal 1997, fa parte del Direttivo del Comitato Italiano per la Valutazione di Qualità del Laboratorio Biologico e dal 2003 è componente del gruppo di lavoro nazionale Clinical Quality Assessment of Tumor Biomarkers, sotto l'egida del Ministero della Salute.

Le nuove frontiere della proliferazione cellulare

Quando la professoressa Silvestrini è andata in pensione, Maria Grazia Daidone viene nominata responsabile dell'Unità Operativa numero 10 (Marcatori biomolecolari nella prognosi e nella terapia dei tumori) che, dal 2005, è diventata Struttura Complessa di Ricerca

Traslazionale come riconoscimento del lavoro svolto negli ultimi dieci anni. Il suo campo di attività comprende la caratterizzazione biomolecolare dei tumori umani e delle lesioni preneoplastiche, gli studi traslazionali in tumori umani solidi e dei fattori citoprotettivi nella progressione tumorale, l'identificazione e validazione di potenziali bersagli molecolari per approcci terapeutici innovativi.

“Affiancata dalle mie colleghe, diventate nel frattempo mie buone amiche, in questi anni ho collaudato la validità di molti biomarcatori tumorali soprattutto per quanto riguarda il tumore al seno. Un impegno importante e che ci ha dato grande soddisfazione nell'ambito dei recettori ormonali e degli indici di proliferazione. È vero anche che risultati inizialmente incoraggianti, suscitati dalla scoperta di un nuovo marker, non sono poi stati riconfermati su casistiche di maggiori dimensioni. In alcuni casi, inoltre, la presenza di un biomarcatore è senza dubbio associata all'andamento della malattia ma la sua determinazione non porta ad alcun vantaggio clinico. Dall'anno 2000, comunque, la nostra Unità Operativa non determina più i recettori ormonali ^ compito assunto dall'anatomia patologica ^ né la proliferazione cellulare. Adesso ci stiamo dedicando a studi sull'identificazione e caratterizzazione del comparto di cellule a elevata tumorigenicità. Si potrebbero definire cellule staminali tumorali o progenitori”.

Di recente, il laboratorio diretto da Maria Grazia Daidone ha sviluppato un modello in vitro che consente l'isolamento e l'espansione di cellule staminali / progenitori di carcinoma mammario sia da campioni chirurgici sia da linee stabilizzate di tumori umani. Queste cellule, presenti in una minima frazione (generalmente circa 1-2% nei tumori umani) e identificabili in base all'espressione di due antigeni presenti sulla membrana cellulare, sono in grado di riprodurre nei topi lo stesso tumore di origine, anche quando inoculate a bassissime concentrazioni (1.000 cellule con caratteristiche di staminalità rispetto al milione di cellule totali necessarie quando non si effettua una selezione in base a tali caratteristiche).

“Le cellule staminali all'origine delle neoplasie condividono alcuni aspetti con le cellule staminali normali adulte, per esempio la capacità di autorinnovarsi e di generare a loro volta cellule con diversi tipi di differenziazione, di crescere, di migrare e di eludere i meccanismi antiapoptotici. Contrariamente a quanto ci si



potrebbe aspettare, queste cellule non proliferano molto, lasciando alle loro figlie il compito di accrescere la massa tumorale. Oltre a questo, sono generalmente resistenti a farmaci e radiazioni. Grazie al modello sperimentale che abbiamo messo a punto, recentemente pubblicato sull'autorevole rivista internazionale Cancer Research, disponiamo di colture cellulari arricchite da queste cellule staminali / progenitori tumorali, un'opportunità attualmente unica con applicazioni dirette in campo diagnostico e nella gestione terapeutica di pazienti con carcinoma mammario. Infatti lo studio di tale modello, oltre ad approfondire le conoscenze sulla biologia del carcinoma mammario, potrebbe consentire l'individuazione e lo sviluppo di reagenti utili a scopo diagnostico e prognostico, così come di molecole e trattamenti innovativi specificamente indirizzati contro la componente staminale del tumore. Siamo sempre più focalizzati sull'aspetto proliferativo e sulla morte cellulare. Lo testimonia anche uno studio sulla telomerasi, condotto dalla mia collega Nadia Zaffaroni. Interferire con il controllo di questo enzima, che gli elementi neoplastici riescono ad attivare aumentando la propria sopravvivenza, significa alterare la normale attività della cellula tumorale, mettendole i bastoni tra le ruote. L'attenzione dei miei collaboratori è concentrata anche su survivina, una proteina selettivamente espressa nelle cellule tumorali. Survivina svolge un'azione citoprotettiva con-

trapponendosi all'apoptosi e favorendo la proliferazione cellulare: andare ad abbassare l'espressione di survivina con molecole antisense e ribozimi favorisce la morte cellulare spontanea e sensibilizza le cellule tumorali alle radiazioni e all'azione di alcuni farmaci, come il cisplatino o il taxolo. In questi ultimi anni ci siamo dunque dedicati con grande soddisfazione alla caratterizzazione dei meccanismi cellulari, al ruolo dei telomeri e della telomerasi in oncologia, all'apoptosi e a come riuscire a interferire con la sopravvivenza degli elementi neoplastici. Gli esperimenti, così come accadeva negli anni settanta, sono condotti direttamente sui tumori umani. Apprezzo molto che in laboratorio convivano due anime: quella di base, che approfondisce la ricerca sulle linee cellulari e sui modelli sperimentali, e quella che studia le applicazioni sulle cellule tumorali, stabilendo se i fattori ottenuti con la ricerca di base sono realmente importanti per la prognosi e per la risposta al trattamento, o nella diagnosi precoce e nel monitoraggio della malattia.

Riuscire a integrare uno studio di base con uno studio applicativo è senz'altro un valore aggiunto del nostro lavoro. Ecco un esempio concreto: da un lato il gruppo di Nadia Zaffaroni ha dimostrato che nelle linee cellulari di carcinoma ovarico i livelli di survivina erano associati alla risposta al taxolo; contemporaneamente, ma in modo autonomo, in un altro settore del laboratorio si è approfondita l'espressione di survivina su preparati istologici di carcinomi ovarici, scoprendo che la presenza di questa proteina ostacola la risposta alla terapia. A un certo punto abbiamo coordinato queste osservazioni verificando l'esistenza di due prove indipendenti della stessa scoperta e una rafforzava l'altra.

Analogamente, ora stiamo lavorando sui meccanismi alternativi di mantenimento dei telomeri, chiamati meccanismi ALT, sui liposarcomi umani con risultati molto interessanti in merito alla loro rilevanza prognostica" spiega la ricercatrice.

All'Istituto dei Tumori di Milano certo non mancano i momenti di confronto con i colleghi di altri dipartimenti. "È fondamentale mantenere una forte integrazione tra il laboratorio, l'anatomia patologica, la chirurgia, l'oncologia medica e la radioterapia per evitare di focalizzare la nostra attività su aspetti che non corrispondono alle esigenze dei clinici. Ci deve essere uno scambio biunivoco con il medico che opera a contatto con il malato, solo così entrambi possiamo confrontare i nostri bisogni e trovare insieme una soluzione. È una condivisione di fini che permette a chi lavora in laboratorio di mantenere il contatto con il paziente e di indirizzare in modo proficuo la propria attività".

A livello internazionale, la ricercatrice è direttamente coinvolta in gruppi di lavoro europei e americani: "Nel 2003 sono stata nominata vicepresidente del Receptor & Biomarker Group dell'European Organization for Research and Treatment, esperienza utile a misurarsi con i colleghi laboratoristi europei che caratterizzano dal punto di vista biomolecolare i tumori umani nel Vecchio Continente. La mia collega Nadia Zaffaroni è di recente diventata chairman di uno dei gruppi più importanti di ricerca farmacologica preclinica dello stesso EORTC. Oltreoceano abbiamo organizzato congressi insieme con i colleghi statunitensi dell'National Cancer Institute, indirizzati allo studio del trasferimento di informazioni biologiche dal laboratorio al letto del paziente e viceversa, fondamentali soprattutto ora con la disponibilità dell'analisi dei profili di espressione genica e proteica".

Nell'anno 2000, l'impegno del laboratorio milanese viene premiato con un riconoscimento autorevole: Maria Grazia Daidone è relatore alla NIH-NCI Consensus Development Conference sul trattamento adiuvante del carcinoma della mammella, una conferenza organizzata ogni dieci anni per fare il punto su un determinato aspetto della cura della malattia. "In quell'occasione sono stata invitata per illustrare lo stato dell'arte della proliferazione cellulare: l'unica italiana, su un totale di quattro europei di fronte a una platea di ricercatori. Da trattenere il fiato".

Le banche dei tessuti e l'innovazione

“Nel 1975 era possibile segnalare una variabile biologica alla volta. Adesso possiamo, in tempi estremamente rapidi, con tecniche potenti e affidabili, studiare l'espressione di 20 mila geni contemporaneamente sullo stesso campione tumorale.

Nel mio settore la tecnologia ha goduto di innovazioni sostanziali, soprattutto dopo il sequenziamento del genoma umano, fattore positivo ma che comporta un continuo processo di aggiornamento indispensabile per non rimanere in debito di risorse. Nel corso degli anni abbiamo preso atto che da soli non si vince. È soprattutto facendo squadra, non solo nell'ambito di un istituto e di una nazione ma anche a livello internazionale, che si ottengono i migliori risultati. Valga da esempio lo studio dei profili di espressione genica nel carcinoma della mammella: i primi sono stati condotti con tecnologia statunitense ma il materiale biologico analizzato proveniva da banche di tessuti europee. Non va sottovalutata l'importanza di possedere metodi bioinformatici avanzati e risorse tecnologiche potenti, tuttavia questi strumenti rischiano di rimanere muti se non si investe nell'organizzazione di banche di materiale biologico efficienti e aggiornate con le informazioni cliniche del paziente, sempre nel rispetto della riservatezza e cautelando lo sfruttamento dei dati” dice Daidone.

Anche su questo fronte, l'Istituto era già all'avanguardia negli anni settanta.

“Le nostre banche di tessuti risalgono a trent'anni fa. Erano organizzate talmente bene che tutt'ora utilizziamo i campioni conservati in esse per gli studi traslazionali sulle caratteristiche del tumore, mettendo in relazione i dati con il decorso clinico”.

In virtù di questa esperienza, la ricercatrice affiancherà XXXX Carbone, direttore del Dipartimento di anatomia patologica, nel compito di organizzazione la nuova banca di materiale biologico.

“Se dietro la provetta non vedo un paziente non mi sento realizzata” esclama Maria Grazia Daidone. “Se è vero che la creatività di un ricercatore si esprime nelle prime fasi della sua attività, è giusto che ora sia io a prendermi carico della burocrazia, della stesura di programmi di ricerca e delle pubblicazioni sollevando dalla pastoie burocratiche i ragazzi che lavorano al banco. Ora ho un ruolo di supervisione ma non credo che esista una ricerca di serie A e una ricerca di serie B.

Esiste la ricerca fatta bene e la ricerca fatta meno bene. Impegnarsi per mettere a punto un processo è un ruolo molto importante: sono a stretto contatto con le procedure normative e di etica che mettono in luce come sia importante salvaguardare il paziente e i suoi diritti. La persona che accetta di partecipare alla banca dati deve essere resa consapevole del suo spirito di solidarietà e collaborazione al futuro della ricerca. A mio parere la missione della medicina è semplicemente fornire a ciascun paziente il miglior trattamento possibile per la sua patologia e, contemporaneamente, trasformare le nuove acquisizioni biologiche nei migliori trattamenti possibili. Si sta generando un nuovo tipo di ricercatore, aperto alle nuove tecnologie ma che non trascura il metodo perché un'idea va seguita, dimostrata o confutata. Sempre mantenendo onestà mentale e intellettuale. L'eterogeneità biologica ci mette in difficoltà ma noi cerchiamo di rendere difficile la vita al tumore. È evidente che ci stiamo muovendo verso la personalizzazione del tumore e la messa a punto di farmaci ad personam ed è proprio per questo motivo che la medicina molecolare è decisamente la medicina del futuro. Trent'anni fa, empiricamente, si mettevano in coltura le cellule del tumore del signor X con un farmaco e si andava a verificare come la molecola interferiva nella sintesi di Dna e Rna valutando la sua attività.

L'approccio era un po' empirico ma l'idea è la stessa ora come allora: solo che prima guardavamo dal buco della serratura e ora stiamo spalancando la finestra. Lavorare all'interno di centri, come l'Istituto dei Tumori di Milano, ove si coniuga assistenza e ricerca credo sia la chiave per essere protagonisti di questa rivoluzione”.