

I biomarker nel carcinoma dell'ovaio: quale aiuto dalla genomica e dalla proteomica?

Andrea Tinelli*, Daniele Vergara**, Giuseppe Leo***, Roberta Martignago[□], Maurizio Pisanò***, Antonio Malvasi[°], Raffaele Tinelli*, Marcello Pellegrino[□], Stefania Vadrucci[□], Fabio Storelli^{°°}, Michele Maffia^{°°}, Santo Marsiliante^{°°}, Vito Lorusso^{°°°}

* Unità Operativa di Ostetricia e Ginecologia, Ospedale Vito Fazzi, Lecce

** NNL - Distretto tecnologico ISUFI (Istituto Superiore Universitario di Formazione Interdisciplinare), Università degli studi di Lecce

*** Unità Operativa di Biologia Molecolare e Oncologia Sperimentale, Ospedale Oncologico, ASL Lecce, Lecce

□ Unità Operativa di Anatomia Patologica, Ospedale Oncologico, ASL Lecce, Lecce

□□ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali, Laboratorio di Anatomia Umana, Università degli Studi di Lecce, Lecce

° Dipartimento Materno-Infantile, Ospedale "Santa Maria", Bari

°° Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali, Università degli Studi di Lecce, Lecce

°°° Unità Operativa di Oncologia, Ospedale Oncologico ASL Lecce, Lecce

Riassunto

Il cancro ovarico rappresenta una delle forme di tumore della sfera genitale femminile con la prognosi più infausta e con la peggiore aspettativa di vita; molti studi e vari dati scientifici hanno focalizzato l'attenzione sull'individuazione di biomarkers per il cancro dell'ovaio, che possano identificare precocemente la neoplasia e possano avere applicazioni dirette nel follow-up.

L'evoluzione della tecnologia biomedica ha accelerato tale processo, ma l'efficacia di tali ricerche deve essere ancora dimostrata; gli studi correnti, che focalizzano l'attenzione sul profilo genico e proteomico della patologia ovarica neoplastica, potrebbero differenziare la malattia metastatica dalla patologia primaria, con un notevole impatto sul management della neoplasia.

Da qui il grande interesse nell'identificazione dei biomarkers molecolari prognostici e indicatori proteici, indirizzati a guidare il trattamento e il follow up clinico; in questo elaborato, difatti, si discute sull'utilizzo di nuove molecole come biomarkers, sviluppate su base proteomica e genomica, per migliorare il trattamento del cancro dell'ovaio e seguirne il follow up.

INTRODUZIONE

Nonostante i notevoli progressi compiuti dalla ricerca nel campo delle patologie tumorali, queste rappresentano ancora oggi una delle principali cause di morte nei paesi occidentali. In molte sue forme, la gravità della malattia al momento della diagnosi è un fattore importante per lo sviluppo del successivo trattamento e dunque è forte la necessità di individuare delle molecole che possano essere indicatrici di un processo maligno già nelle prime fasi.

Sebbene le ricerche condotte nel campo dei biomarker, con lo scopo di definire meglio il trattamento del cancro, si stiano muovendo rapidamente, la possibilità di utilizzare concretamente tali molecole nella pratica clinica rimane ancora elusiva.

Proprio al fine di coordinare il lavoro dei ricercatori impegnati nell'individuazione di biomarker, il National Cancer Institute (NCI) ha stabilito, tramite l'Early Detection Research Network (EDRN), una struttura formale, divisa in cinque fasi, per la guida del processo che porta allo sviluppo di un biomarker; queste fasi includono gli studi di esplorazione pre-clinica, lo sviluppo di una tecnica clinica, uno screening retrospettivo e prospettico ed, infine, uno studio clinico volto ad accertare l'ef-

ficacia del biomarker nella popolazione (1). Nel caso dei marker di natura proteica vi è stato in questi anni un enorme incremento nel numero di pubblicazioni riguardanti l'utilizzo di molecole proteiche come possibili biomarker, soprattutto nel siero, ma di pari passo il numero dei test sierici proteici, approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) statunitense, è diminuito. Inoltre, nessuna delle molecole approvate è stata scoperta tramite le più recenti tecnologie proteomiche o genomiche (2).

In questo elaborato ci focalizzeremo sull'uso potenziale di nuove molecole proteiche come possibili marker di diagnosi e/o prognosi del cancro ovarico; l'attenzione sarà rivolta non solo verso i marker sierici ma anche verso quelle proteine identificate a livello tissutale, la cui espressione sembra essere in grado di riflettere i meccanismi cellulari e molecolari di insorgenza e di progressione neoplastica, giacché a questa categoria appartengono proteine coinvolte in diverse pathway cellulari, dalla trasduzione del segnale al metabolismo energetico.

Particolarmente interessante è il ruolo di quelle molecole di segnale che regolano le interazioni delle cellule tumorali con il microambiente circostante, che andremo ad analizzare.

Parole chiave

Cancro ovarico, Markers, Genomica, Proteomica, Biotecnologie

Summary

Biomarkers in Ovarian Cancer: Which Genomics and Proteomics Helping?

The ovarian cancer has, between the gynaecological malignancies, the poorest prognosis and the bad overall and disease-free survival rates; several researches and clinical dates on ovarian cancers focused on the identification of early diagnostic and prognostic biomarkers for their applications, also in clinical follow up. Some biotechnologies accelerated this process, but the sensibility and sensitivity of ovarian cancer novel biomarkers still need to be validated; these extensive researches, targeting gene profiling and proteomics, could help in differentiation between patients with metastatic ovarian cancer and primary ovarian carcinomas, with a large potential impact on cancer management.

So, the considerable interest in identifying molecular prognostic biomarkers and protein indicators guides the treatment decisions and the clinical follow up; in this elaborate we discuss the use of novel molecules, developed on the proteomics and genomics, to improve the anticancer therapy for malignant ovarian tumors and to monitor their clinical follow up.

Key words

Ovarian cancer, Markers, Genomics, Proteomics, Biotechnologies

IL CARCINOMA OVARICO: UNA PANORAMICA

Il carcinoma ovarico rappresenta nel mondo circa il 32% delle patologie tumorali ginecologiche, è causa di circa il 55% dei decessi femminili per neoplasia, globalmente colpisce in peri e postmenopausa con un massimo d'incidenza fra i 60 e i 70 anni (3).

La frequenza di sopravvivenza per carcinoma dell'ovaio è simile a quella di altri tumori solidi maligni, ma approssimativamente il 75% delle volte che si diagnostica una neoplasia ovarica, la massa tumorale ha già "silenziosamente" metastatizzato al momento della diagnosi, al III o IV stadio, incrementandone severamente la mortalità (4).

Il ritardo diagnostico associato a questa neoplasia è provocato dalla quasi totale asintomaticità della patologia, sia al momento dello sviluppo che al momento della metastatizzazione ad altri organi; il riscontro occasionale, durante una visita ginecologica, di una massa pelvica palpabile o, durante l'esecuzione di un'ecografia pelvica, di una cisti ovarica può condurre il sanitario ad ulteriori accertamenti diagnostici (5).

Comunque la gran parte di masse pelviche obiettivamente palpabili non rappresentano una patologia maligna, soprattutto in donne in premenopausa, e non sembrano giustificare ulteriori accertamenti di screening per patologia ovarica maligna (6).

Il CA125 sierico e l'ecografia pelvica transvaginale o transaddominale hanno aiutato e non poco il ginecologo nella diagnosi e nel monitoraggio di una formazione ovarica "sospetta", tanto che sono stati inclusi fra gli esami standard nella normale routine clinica di accertamento diagnostico in una massa pelvica. Il CA125, antigene individuato nel 1981, è l'unica molecola sierica significativamente associata al cancro ovarico; normalmente ha valori inferiori a 35 U/mL, è presente a concentrazioni elevate nel siero di circa il 90% delle pazienti con tumore ovarico in III e IV stadio e solo, purtroppo, in circa il 50% delle pazienti con tumore a stadi precedenti (3).

Tali percentuali, purtroppo, non sono sufficientemente diagnostiche e sono limitate da un numero alquanto elevato di pazienti falsi positivi ad uno screening di massa sulla popolazione generale, visto che il CA125 è dosabile anche in donne con patologie gineco-

logiche benigne e in donne in premenopausa; tale riscontro ne riduce, purtroppo, sia la sensibilità che la specificità rispettivamente al 75% e al 90% (5).

Numerosi studi clinici concordano che non esiste una correlazione fra la dimensione tumorale residua dopo il primo intervento demolitivo laparotomico e i livelli sierici del CA 125, mentre tale antigene viene comunemente utilizzato nel follow up della terapia antitumorale e nelle pazienti libere da tumore (4). Altri markers diagnostici, quali il CEA, il CA 19-9 e il CA15-3, sono stati utilizzati nel carcinoma dell'ovaio, ma solamente il β HCG nel corion carcinoma e l' α FP nel tumore del seno endodermico hanno offerto buone garanzie di specificità; il solo dosaggio sierico del CA125 quindi, non è sufficiente per far diagnosi di carcinoma ovarico in stadio iniziale (7). L'utilizzo, invece, di tale antigene in associazione con l'ultrasonografia, può effettivamente essere utile nel diagnosticare una neoplasia ovarica in stadio iniziale nella popolazione generale: altri studi hanno confermato l'efficacia di questa combinazione diagnostica nello screening di tale neoplasia nella popolazione generale ed in quella ad alto rischio (6). L'ecografia è un esame di screening molto semplice da eseguire, con un'elevata accettabilità delle pazienti ed è scevro da complicanze; per tale motivo, quando si evidenzia una formazione cistica con caratteristiche ultrasonografiche di benignità, non occorre eseguire ulteriori accertamenti diagnostici, ma basta seguire un normale follow-up ecografico (3).

Tuttavia ulteriori studi eseguiti con indagini ecografiche non hanno dimostrato né sensibilità né specificità adeguate per una diagnosi precoce di carcinoma ovarico, il che si traduce in un'impossibilità ad utilizzare esclusivamente l'ecografia pelvica nella diagnosi del carcinoma ovarico, visto che la storia naturale del carcinoma ovarico è sconosciuta e la possibilità che queste neoformazioni subiscano una trasformazione maligna non può essere omessa.

In diverse casistiche si rileva infatti che il potenziale di malignità di tali neoformazioni "ecograficamente benigne" è risultato compreso tra lo 0% ed il 5% (6).

Dalle considerazioni suddette, quindi, è possibile concludere che attualmente nessun sin-

golo marker sierico efficace è realmente disponibile nella diagnostica di laboratorio utilizzabile per una diagnosi precoce di cancro ovarico (8).

I MARKERS PER IL CANCRO OVARICO EPITELIALE: STATO DELL'ARTE

Il cancro ovarico epiteliale è una malattia complessa, nonché la seconda forma di cancro ginecologico più comune e la causa di circa la metà delle morti associate alle malignità ginecologiche pelviche.

Largamente asintomatico, al momento della diagnosi, più del 70% dei pazienti con cancro ovarico si trovano, come detto, già in uno stadio avanzato di malattia (9).

Il **CA125** rappresenta il marker sierico più utilizzato nel cancro ovarico, sebbene il suo ruolo nello screening iniziale della malattia sia controverso; tale proteina appartiene alla famiglia delle mucine, proteine ad alto peso molecolare che normalmente rivestono gli epitelii (10).

In virtù della loro localizzazione, le mucine svolgono ruoli estremamente importanti nella fisiologia cellulare come, ad esempio, l'adesione cellulare; alterazioni della loro struttura oligosaccaridica sono state riscontrate in diverse forme tumorali (11).

Il CA125 è un marker utile per la valutazione della risposta alle chemioterapie, per diagnosticare le ricadute e per distinguere le masse benigne da quelle maligne (12-13).

La messa a punto di un algoritmo, che ha permesso di calcolare il rischio di tumore alle ovaie in base ai livelli sierici di CA125, ha evidenziato, però, come circa il 20% dei casi analizzati mostrasse una bassa o addirittura assente espressione di CA125 e ha fatto comprendere l'importanza dell'identificazione di nuovi marker sierici o di molecole capaci di complementarsi o sostituire il CA125, per la diagnosi precoce del cancro alle ovaie (14).

L'**inibina** rappresenta un nuovo marker per la diagnosi del cancro ovarico ed è una glicoproteina che esiste come un dimero di due subunità (α e β A o β B) per formare l'inibina A ($\alpha\beta$ A) e B ($\alpha\beta$ B).

Dal punto di vista biochimico, l'inibina appartiene ad una famiglia di fattori di crescita prodotti principalmente dai follicoli ovarici, che giocano un importante ruolo nella fertilità femminile; infatti, dopo l'ovariectomia o

in menopausa, in seguito a deplezione dei follicoli ovarici, i livelli sierici delle inibine si riducono drasticamente e, dopo la menopausa, i livelli circolanti dell'inibina divengono non rilevabili (15).

Al contrario, i livelli sierici totali dell'inibina hanno dimostrato di essere elevati in post-menopausa nelle pazienti affette da cancro dell'ovaio, soprattutto nelle neoplasie a cellule della granulosa e nei sottotipi mucinosi delle neoplasie epiteliali (16).

Alcuni autori hanno evidenziato che l'inibina, se utilizzata da sola o in associazione con il CA125, può essere di grande aiuto nell'individuazione del cancro ovarico, in quanto nella pazienti in post-menopausa permette il riconoscimento della neoplasia ovarica, anche se, purtroppo, in stadio avanzato; infatti, l'inibina in associazione al CA125, presenta valori di sensibilità del 95% con il 95% di specificità (17).

Secondo una recente review sulle inibine, pubblicata sulla rivista *Cancer Letters* nel maggio 2007, il dosaggio dell'inibina totale ha maggiore efficacia come marker precoce rispetto al dosaggio delle varie subunità della molecola, nelle pazienti in post-menopausa.

NUOVI MARKERS PROTEICI PER IL CANCRO OVARICO: IL RUOLO DELLA GENOMICA E DELLE MODERNE BIOTECNOLOGIE

La **mesotelina** è una proteina cellulare di superficie presente sulle cellule mesoteliali normali che rivestono il lume delle cavità corporee ed è altamente espressa in varie forme di cancro, compreso quello dell'ovaio.

Utilizzando topi mancanti per il gene della mesotelina, alcuni ricercatori hanno sviluppato un anticorpo monoclonale contro la proteina e messo a punto un sistema ELISA per il dosaggio della mesotelina nel siero.

Alti livelli della proteina sono stati trovati nei pazienti con mesotelioma e cancro dell'ovaio (18), inoltre, i livelli della proteina aumentano progredendo dalle forme più precoci a quelle più avanzate di cancro (19).

Importanti risultati sono stati ottenuti anche nel campo della prognosi e nella risposta al trattamento.

STAT 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) funziona come fattore di trascrizione latente in molte neoplasie; risiede

generalmente nel citoplasma e può essere attivato attraverso fosforilazione da parte di un'enorme varietà di citochine, ormoni e fattori di crescita che agiscono, utilizzando proprio la via di segnale da esso attivata, regolando diverse risposte biologiche, incluso lo sviluppo cellulare, la differenziazione, la proliferazione, la motilità e la sopravvivenza (20). L'espressione di STAT3 fosforilata risulta essere aumentata nel carcinoma ovarico primario e la sua localizzazione nucleare predice una prognosi infausta (21).

LPAAT- β è, invece, un enzima (del quale attualmente si conoscono sei isoforme) che catalizza l'acetilazione dell'acido lisofosfatidico generando l'acido fosfatidico (PA), agendo come secondo messaggero in numerose vie di regolazione cellulare, ma anche in diversi pathway di proliferazione e sopravvivenza della cellula tumorale.

L'aumento di espressione dell'enzima è stato correlato con una prognosi infausta nelle malignità ginecologiche ed è associato con una minore sopravvivenza (22).

Tra i fattori prognostici del cancro ovarico rientrano molti membri della famiglia tissutale delle **callicreine umane** (hK), un gruppo di serina-proteasi.

I geni di tale famiglia sono organizzati in un grande cluster localizzato sul cromosoma 19q13.4. Diversi studi di immunocistochemica hanno riportato come la hK8 possa essere considerato un marker di prognosi favorevole nei pazienti con cancro ovarico (23,24).

La **piruvato chinasi** (PK) è un enzima chiave della glicolisi. L'isoenzima M2-PK, diversamente dalle altre isoforme, mostra una struttura dimerica in diverse forme di tumore e poiché molte forme dimeriche sono overespresso nelle cellule tumorali, è stato ribattezzato Tu M2-PK; quest'enzima è presente nei fluidi biologici ed è rilasciato dalle cellule tumorali a seguito di necrosi e del turnover delle stesse.

È stato inoltre dimostrato che la determinazione di Tu M2-PK in circolo rappresenta un eccellente discriminante per distinguere tra le forme benigne e quelle maligne di tumore e fornisce informazioni aggiuntive sulla sensibilità alla chemioterapia (25).

In un recente studio condotto da Ahmed e collaboratori, è stata ipotizzata una possibile associazione tra i livelli plasmatici di TuM2-

PK e la malignità del tumore ovarico, dimostrando come la sua concentrazione fosse più elevata nei soggetti malati, soprattutto in quelli che si trovavano in uno stadio avanzato della neoplasia (26).

Gli stessi autori in un successivo lavoro hanno cercato di determinare il valore di cut-off per la sensibilità e le specificità con le quali tale proteina permette di differenziare tra le forme benigne e quelle maligne di carcinoma ovarico.

La concentrazione media di M2-PK era di 52 U/ml nei soggetti con carcinoma ovarico, contro 17 U/ml riscontrati nei pazienti con una condizione benigna ($p < 0.001$). Ad un valore di cut-off di 22 U/ml, la sensibilità di M2-PK nell'individuare il tumore era del 70%, con una specificità del 65% (27).

Il protoncogene **c-Met** (Mesenchymal epithelial transition factor) codifica per un recettore di membrana con attività tirosina-chinasi (28).

La proteina è ampiamente espressa nei tessuti di mammifero ed implicata in numerosi processi cellulari. Ligando del recettore è il fattore di crescita degli epatociti (HGF, hepatocyte growth factor) conosciuto anche come *scatter factor* (SF).

L'overespressione e/o l'attivazione di c-Met è stata implicata in numerose patologie tumorali.

Recentemente, Sawada e collaboratori hanno analizzato il ruolo di c-MET nella biologia del carcinoma ovarico e la sua possibile applicazione come target terapeutico; ciò che è emerso è l'over-espressione di c-MET soprattutto nei soggetti che si trovano in uno stadio avanzato della malattia (29).

Che i livelli di espressione di c-Met potessero rappresentare un potenziale marker prognostico per i pazienti affetti da EOC in stadio avanzato, era stato già dimostrato negli studi condotti da Ayhan e collaboratori (30). Nello studio condotto nel 2007 da Sawada, però, il silenziamento del messaggero di c-Met in cellule SKOV-3ip1 ha provocato una inibizione dell'adesività delle cellule a diversi componenti della matrice extracellulare e verso cellule mesoteliali primarie umane; in parallelo ad una riduzione significativa delle integrine alfa e beta e dell'attività delle urochinasi e delle (MMP)-2/MMP-9. Questi risultati hanno suggerito come l'overespressione

di c-MET potesse rappresentare un fattore prognostico nel carcinoma ovarico e che bloccando in vivo l'azione di c-Met sarebbe stato possibile inibire la disseminazione peritoneale e l'invasione tumorale attraverso un meccanismo alfa/beta-integrina dipendente (28).

Inoltre, Maggiora e collaboratori nel 2003 avevano stabilito una relazione tra c-MET e RON, un altro membro appartenente alla famiglia genica dei recettori tirosin-chinasici, la cui mutazione è correlata alla tumorigenesi. È stato dimostrato che, in vitro, i due recettori interagiscono, sinergizzano nelle stesse vie di segnale e cooperando nell'indurre risposte morfogeniche; lo stesso studio ha dimostrato che gli oncogeni RON e c-MET sono espressi rispettivamente nel 55% e 56% dei casi di carcinoma ovarico umano e sono co-espressi nel 42% ($P < 0.001$), ipotizzando che la loro azione possa promuovere la progressione del carcinoma ovarico (31).

Nonostante gran parte delle molecole considerate come possibili biomarker siano prodotte direttamente dalle cellule tumorali, evidenze recenti puntano l'attenzione sul microambiente tumorale non solo come fattore importante nel processo di carcinogenesi ma anche come fonte di nuovi marker.

Infatti, il microambiente tumorale è costituito da un complesso sistema di diversi tipi cellulari come macrofagi, fibroblasti, cellule endoteliali, linfociti, che partecipano attivamente nel processo di progressione tumorale attraverso la produzione di numerose sostanze direttamente misurabili nei fluidi biologici (32).

Le metallo proteasi di matrice (**MMP**) sono un gruppo di enzimi proteolitici calcio-zinco dipendenti capaci di degradare molti componenti della matrice extracellulare e possono essere prodotte sia dalle cellule tumorali che dalle cellule stromali intorno (33).

Alti livelli di espressione, da parte delle cellule stromali, delle metalloproteasi MMP-2, MMP-9 e MT1-MPP, una sottoclasse di enzimi non solubili ma legati alla membrana cellulare, sono stati correlati con una prognosi infausta nei pazienti con EOC (34).

EphA2 è un recettore tirosina chinasi di 130KDa appartenente alla famiglia Eph. EphA2 è overespresso in molte forme di cancro, incluso quello ovarico, dove la sua espressione viene correlata ad un comporta-

mento più aggressivo del cancro stesso (35). Il ruolo di EphA2 nella tumorigenesi sembra riguardare, tra l'altro, i processi di invasione e di angiogenesi; infatti, i livelli di espressione di questo recettore nelle cellule endoteliali ed in quelle tumorali sono associati ad una maggiore densità dei microvasi ed ad un'alta espressione delle metalloproteasi MMP-9, MMP-2, MT1-MMP (36).

Il **PDEF** appartiene alla famiglia ETS di fattori di trascrizione, caratterizzati da un dominio conservato di 85 aminoacidi che lega il DNA; essi sono fattori residenti nel nucleo e partecipano come effettori del segnale nella via Ras-MAPK.

Il meccanismo attraverso il quale sembrano svolgere un ruolo nella tumorigenesi o nella progressione del cancro ovarico rimane ancora sconosciuto; tali fattori potrebbero alterare la fisiologia dei tumori ovarici epiteliali forse in modo simile a quanto studiato nelle linee cellulari di cancro alla mammella, dove aumentano significativamente la mobilità e l'invasività.

L'espressione di questo fattore di trascrizione è stata studiata sia a livello dell'mRNA, che proteico. I dati ottenuti dimostrano come il 70% dei tumori ovarici over-esprima l'mRNA; al contrario, solo per il 33% dei tumori nello stadio avanzato overesprimevano la proteina PDEF (37).

Diverse evidenze suggeriscono un link tra il processo infiammatorio e l'insorgenza del cancro (38).

Numerose molecole prodotte dalle cellule infiammatorie, da quelle tumorali o da altre cellule associate al tumore, come i fibroblasti, svolgono il ruolo di mediatori tra questi due eventi.

Le citochine sono una eterogenea famiglia di proteine a basso PM prodotte dalle cellule immunitarie ma anche dalle cellule tumorali stesse, che possono agire sia stimolando, che inibendo la crescita e la progressione tumorale (39).

L'**interleuchina 13** (IL-13) è una citochina con attività antinfiammatoria prodotta dalle cellule T, che svolge un ruolo importante in molte attività biologiche compresa l'insorgenza del cancro.

L'IL-13 agisce legandosi al proprio recettore di membrana (IL-13R) costituito da due catene, IL13Ra1 ed IL13Ra2; un'espressione alte-

rata di questa citochina è stata descritta nel tessuto tumorale rispetto al tessuto ovarico normale (40).

Alti livelli della catena $\alpha 2$ sono stati rivelati in 44 su 53 (83%) campioni di tumore ovarico maligno (41).

Livelli elevati del fattore inibitorio di migrazione dei macrofagi (MIF) sono stati trovati nel sangue dei pazienti affetti da cancro ovarico (sensibilità e specificità del 77,8% e 53,3% rispettivamente) (42).

Studi condotti su co-culture di cellule macrofagiche e linee cellulari tumorali hanno dimostrato come l'espressione di MIF sia indotta in maniera JNKII- e NF- κ B-dipendente ed agisca inducendo il rilascio di MMP dai macrofagi, promuovendo quindi l'invasività delle cellule tumorali (43).

L'NGAL (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin) è una proteina appartenente alla famiglia delle lipocaine. È conservata all'interno di specifici granuli nei neutrofili ed interviene nel limitare la crescita batterica al sito d'infezione. Le lipocaine presentano spesso un'espressione diversa nei tessuti tumorali rispetto alla loro controparte normale. L'espressione di NGAL è più alta sia nel tessuto che nel siero dei pazienti con tumori borderline e di grado 1 rispetto a quelli di grado 2, grado 3 e dei tessuti benigni (44).

La capacità delle cellule tumorali di sfuggire alla sorveglianza del sistema immunitario è stata proposta per la prima volta da Dann e collaboratori come una delle caratteristiche fondamentali del cancro (45).

Una delle vie usate dal tumore per evadere dall'attacco del sistema immunitario è la cosiddetta immunosovversione, cioè la soppressione della risposta immunitaria mediante l'azione di molecole di superficie o solubili.

CD46 è una proteina di membrana che protegge le cellule dalla tossicità mediata dal complemento. Un'analisi immunostochimica condotta su 73 biopsie di cancro ovarico, ha dimostrato come l'espressione di questa proteina sia collegata ad una prognosi meno favorevole (46).

RCAS1 (Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells) è una proteina che induce l'apoptosi delle cellule immunitarie che presentano il recettore per RCAS1, come le cellule T e quelle natural killer (47).

Un'alta espressione di RCAS1 è stata dimo-

strata, mediante studi di immunolocalizzazione, nei casi di tumore alla mammella, del colon-retto e colecisti (48, 49).

Pazienti con il cancro uterino hanno livelli sierici significativamente più alti rispetto a quelli di individui controllo ed, inoltre, i livelli di RCAS1 sono correlati con la risposta al trattamento (50).

RUOLO DELLA PROTEOMICA NELL'INDIVIDUAZIONE DI NUOVI MARKER DI CANCRO OVARICO

Nuove tecniche d'indagine si sono affiancate in questi anni alle metodiche tradizionali affermandosi come importanti strumenti di ricerca per l'individuazione di nuovi possibili biomarker.

L'efficacia di nuove tecniche di ricerca, come lo studio del profilo d'espressione genico, la proteomica, la metabolica, risiede nella possibilità di studiare l'azione di più geni o proteine contemporaneamente.

Ciascun tipo cellulare presente nel nostro corpo ha lo stesso repertorio di geni, ma non tutti sono trascritti contemporaneamente; inoltre, le cellule rispondono a diversi stimoli (come il trattamento genico farmacologico o farmacogenomica) modulando l'espressione dei propri geni o attivando l'espressione di nuovi. Accanto a tutto questo, vi è da considerare che la regolazione del comportamento cellulare è dovuta in buona parte all'azione delle proteine.

Il fatto che le proteine possano subire numerose modificazioni aumenta certamente l'eterogeneità molecolare e la diversità dei prodotti genici.

Come risultato della presenza di più varianti alleliche, dello splicing dell'mRNA e delle modificazioni post-transcrizionali, il genoma umano può generare centinaia di migliaia di prodotti genici partendo dalle 22,500 ORF (open reading frame) stimate (51).

L'elettroforesi bidimensionale (2-DE) accoppiata alla spettrometria di massa è stata una delle tecniche largamente utilizzate allo scopo di individuare nuovi marker proteici per diverse forme di cancro, tra le quali quello ovarico (52).

Dal confronto di sei linee cellulari di cancro ovarico epiteliale, due sensibili e quattro resistenti al platino, Yan e collaboratori hanno individuato tramite 2-DE e spettrometria di

massa, cinque proteine differenzialmente espresse tra le linee cellulari sensibili e quelle resistenti.

Le cinque proteine identificate come annexina A3, destrina, cofilina 1, glutatione-S-transferasi (GSTO1-1) e isocitrato deidrogenasi citosolica NADP+ dipendente (IDHC), si candidano come possibili biomarker di farmacoresistenza (53).

In un recente studio si è andato a valutare il profilo proteomico sierico di donne affette da cancro ovarico epiteliale invasivo, rispetto a quello di donne con altri tipi di cancro ovarico, con masse pelviche benigne o di donne sane.

I biomarker identificati sono stati: l'apolipoproteina A1 (sotto-regolata nei casi di tumore), una forma tronca della transtiretina (sotto-regolata) ed un frammento di taglio della proteina inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 (sovra-regolata).

La sensibilità del modello combinato dei tre biomarker insieme al CA125 è maggiore rispetto a quello del CA125 da solo [74% (95% CI, 52-90% contro 65% (95% CI, 43-84%)] (54). La tecnologia di microdissezione a cattura laser (laser capture microdissection, LCM) è una tecnologia che permette di isolare una popolazione cellulare pura da una sezione di tessuto eterogenea sotto visualizzazione microscopica diretta.

Combinando la tecnologia LCM con le tecniche classiche di proteomica, Brown e collaboratori sono riusciti ad identificare tre proteine, **glioxalasi I**, **Rho GDI** e **FK506**, differenzialmente espresse tra due sottotipi di cancro ovarico, cancro ovarico epiteliale invasivo e tumore ovarico a basso potenziale maligno (55).

Negli ultimi anni, la tecnologia SELDI (Surface-enhanced laser desorption/ionization) è stata introdotta per lo screening rapido di campioni biologici, in particolare del siero.

La tecnica si basa sull'assorbimento selettivo di proteine (<20 KDa) su una superficie biologica o chimica; le superfici chimiche hanno proprietà idrofobiche, idrofiliche, anioniche o cationiche, mentre quelle biologiche hanno anticorpi, frammenti leganti l'antigene, DNA o recettori.

Questa indagine viene utilizzata per l'identificazione di pazienti a rischio per lo sviluppo di cancro, basandosi sull'analisi diretta di

fluidi biologici come il siero, il plasma, il fluido cerebrospinale e le urine.

Petricoin e collaboratori hanno usato questa tecnica per individuare un pattern di espressione proteico a livello del siero, tra soggetti normali e donne con il cancro ovarico, riuscendo ad ottenere con una sensibilità del 100% ed una specificità del 94% in tutti i casi di cancro ovarico che si trovavano allo stadio precoce (56); negli anni successivi, i risultati ottenuti da Petricoin non hanno però trovato conferma da parte di altri laboratori, sollevando dei dubbi sulla loro validità clinica.

Tra i possibili marker del cancro ovarico identificati con la tecnica SELDI-TOF vi è l'**apto-globina** (Hp), una glicoproteina prodotta principalmente dalla cellule del fegato ed implicata nel metabolismo dell'emoglobina. Alti livelli della subunità α dell'Hp sono stati trovati nel siero dei pazienti con cancro ovarico (57).

Sempre utilizzando il siero come campione biologico, Mor e collaboratori hanno messo a punto un test per la diagnosi precoce del cancro ovarico epiteliale basato sulla caratterizzazione dei livelli di espressione di quattro proteine: *leptina*, *prolattina*, *osteopontina (OSP)* e *fattore di crescita insulino simile-II (IGF-II)*; la combinazione delle quattro proteine conferisce al test una sensibilità del 95%, una specificità del 95%, un valore predittivo positivo del 95% ed uno negativo del 94% (58).

Tutti i biomarkers di cui abbiamo discusso sono riportati nella tabella riassuntiva.

CONCLUSIONI

Dalle evidenze emerse dalla nostra review ci sembra rilevante sottolineare come la proteomica e la ricerca genomica e biomolecolare stiano indirizzando gli sforzi nello sviluppo di nuovi marker proteici per il cancro ovarico, cercando di correlare la presenza di molecole segnale e la presenza di cancro ovarico, focalizzando l'attenzione sulla diagnosi precoce di neoplasia e/o il ruolo prognostico delle nuove molecole nel trattamento e il follow up di queste neoplasie.

Purtroppo il corrente utilizzo clinico di questi biomarker è attualmente molto ridotto per la significatività e specificità limitate, tanto che il CA125 e, talvolta, l'inibina sono gli unici markers sierici correntemente utilizzati nel-

TABELLA. Markers diagnostici e prognostici di cancro ovarico

MARKER	TESSUTO/FLUIDO BIOLOGICO	APPLICAZIONE
Inibina	Siero	Marker di diagnosi
LPAAT- β	Tessuto	Marker prognostico infausto
PDEF	Tessuto	Marker di diagnosi
Mesotelina	Siero	Marker di diagnosi Marker di risposta al trattamento Marker di prognosi infausta
hK8	Tessuto	Marker di prognosi favorevole
MMP-2, MMP-9 e MT1-MPP	Cellule Stromali	Marker di prognosi infausta
EphA2	Tessuto	Marker di prognosi infausta
MIF	Siero	Marker di diagnosi
NGAL	Tessuto E Siero	Marker di diagnosi
CD46	Tessuto	Marker di prognosi
IL13Ra2	Tessuto	Marker di diagnosi
RCAS1	Tessuto	Marker di diagnosi e trattamento
Annexina A3, destrina, cofilina 1, GSTO1-1, IDHC	Linee Cellulari	Marker di resistenza al platino
Glioxalase I, Rho GDI, FK506	Tessuto Microdissezionato	Marker di diagnosi
Hp- α	Siero	Marker di diagnosi
Leptina, prolattina, osteopontina (OSP), IGF-I	Siero	Marker di diagnosi

la pratica clinica mondiale.

Per tali motivi, ci si augura che in un futuro non troppo lontano, i brillanti dati sperimentali riportati dalle ricerche evidenziate nel campo dei biomarker dal nostro elaborato, possano essere corroborati da riscontri clinici e terapeutici, al fine di poter disporre, ad un costo relativamente ridotto, con facile riproducibilità, ampia diffusione e facile esecuzione, a titolo non più sperimentale ma effettivo di nuove molecole proteiche, da utilizzare soprattutto per la diagnosi precoce di neoplasia ovarica.

BIBLIOGRAFIA

1. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, Winget M, Yasui Y Phases of Biomarker Development for Early Detection of Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(14): 24-57
2. Ludwig JA, Weisten JN. Biomarkers in Cancer Staging, Prognosis and Treatment Selection. *Nat Rev Canc* 2005; 5: 124-146
3. Calvi N, Tinelli A, Tinelli FG, Latorre A, Lorusso V. Nuove prospettive nel trattamento del carcinoma ovarico. Volume Educazionale

GOIM, Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale, Massimo Lopez Editore, 2006: 169-186

4. Tinelli FG, Tinelli A, Campagnutta E, Kobal B, Rakar S, Manca C, Tinelli R, Perrone A. Current surgical management in ovarian cancer recurrence. *Minerva Ginecol* 2004 Oct;56(5):457-67
5. Giorda G, Bertola G, De Piero G, Sopracordevole F, Sisto R, Martella L, Visentin MC, Tinelli A, Angelini M, Calcagnile F, Campagnutta E. La chirurgia intestinale nel trattamento del cancro ovarico. *Rivista di Ostetricia, Ginecologia pratica e Medicina Perinatale* 2005; 20(3): 6-8
6. Tinelli R, Tinelli A, Tinelli FG, Cicinelli E, Malvasi A. Conservative surgery for borderline ovarian tumors. *Gynecol Oncol*. 2006 Jan;100(1):185-91
7. Tinelli A, Vergara D, Leo G, Moschettini G, Pisanò M, Lorusso V, Forcignanò RC, Malvasi A, Casciaro S, Pitotti E, Vergari U, Storelli F, Marsigliante S. Il carcinoma ovarico: aspetti genetici e ormonali. *Rivista di Ostetricia, Ginecologia pratica e Medicina Perinatale* 2006; 21(3): 26-32
8. Campagnutta E, Bertola G, Tommasi G, Giorda G, De Piero G, Martella L, Sopracordevole F, Visentin MC, Sisto R, Tinelli A, Angelini M, Calcagnile F. Trattamento delle me-

- tastasi epatiche nelle recidive del cancro ovarico. *Rivista di Ostetricia, Ginecologia pratica e Medicina Perinatale* 2004; 19(3): 25-28
9. Ozols RF, Bookman MA, Connolly DC, Daly MB, Godwin AK, Schilder RJ, Xu X, Hamilton TC. Focus on epithelial ovarian cancer. *Cancer Cell* 2004; 5:19-24
 10. Moss EL, Hollingworth J, Reynolds TM. The role of CA125 in clinical practice. *J Clin Path* 2005;58:308-312
 11. Brockhausen I. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO reports* 2006;7:599-604
 12. Riedinger J, Bonnetain F, Basuyau J, Eche N, Larbre H, Dalifard I, Wafflart J, Ricolleau G, Pichon M. Change in CA 125 levels after the first cycle of induction chemotherapy is an independent predictor of epithelial ovarian tumour outcome. *Ann Oncol* 2007; Feb 13: in press
 13. Santillan A, Garg R, Zahurak ML, Gardner GJ, Giuntoli RL II, Armstrong DK, Bristow RE. Risk of epithelial ovarian cancer recurrence in patients with rising serum ca-125 levels within the normal range. *J Clin Oncol* 2005; 23(36):9338-9343
 14. Bast RC Jr, Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, Baggerly KA, Atkinson EN, Skates S, Zhang Z, Lokshin A, Menon U, Jacobs I, Lu K. New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer*. 2005; 15(Suppl. 3):274-81
 15. Mather JP, Moore A, Li RH. Activins, inhibins, and follistatins: further thought on a growing family of regulators. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 1997; 321, 790-793
 16. Jacobs I, Davies AP, Bridges J. Prevalence screening for ovarian cancer in postmenopausal women by CA 125 measurement and ultrasonography. *Br Med J* 1993; 306, 1030-1038
 17. Robertson DM, Cahir N, Burger HG, Marmers P, McCloud PI, Pettersson K, McGuckin M. Combined inhibin and CA125 assays in the detection of ovarian cancer. *Clin. Chem* 1999; 45, 651-658
 18. Hassan R, Remaley AT, Sampson ML, Zhang J, Cox DD, Pingpank J, Alexander R, Willingham M, Pastan I, Onda M. Detection and Quantitation of Serum Mesothelin, a Tumor Marker for Patients with Mesothelioma and Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res* 2006; 12(2), 447-53
 19. Huang CY, Cheng WF, Lee CN, Su YN, Chien SC, Tzeng YL, Hsieh CY, Chen CA. Serum mesothelin in epithelial ovarian carcinoma: a new screening marker and prognostic factor. *Anticancer Res* 2006; 26(6C), 4721-8
 20. Kim DJ, Chan KS, Sano S, Digiovanni J. Signal transducer and Activator of Transcription 3 (Stat3) in Epithelial Carcinogenesis. *Mol. Carcinog* 2007; 46(8), 725-731
 21. Rosen DG, Mercado-Uribe I, Yang G, Bast RC, Amin HM, Lai R, Liu J. The role of constitutively active signal transducer and activator of transcription 3 in ovarian tumorigenesis and prognosis. *Cancer* 2006; 107(11), 2730-40
 22. Diefenbach CSM, Soslow RA, Iasonos A, Linkov I, Hedvat C, Bonham L, Singer J, Barakat RR, Aghajanian C, Dupont J. Lysophosphatidic Acid Acyltransferase-, (LPAAT-) Is Highly Expressed in Advanced Ovarian Cancer and Is Associated With Aggressive Histology and Poor Survival. *Cancer* 2006; 107, 1511-19
 23. Shigemasa K, Tian X, Gu L, Tanimoto H, Underwood LJ, O'Brien TJ, Ohama K. Human kallikrein 8 (hK8/TADG-14) expression is associated with an early clinical stage and favorable prognosis in ovarian cancer. *Oncol Rep* 2004; 11(6), 1153-9
 24. Borgono CA, Kishi T, Scorilas A, Harbeck N, Dorn J, Schmalfeldt B, Schmitt M, Diamandis EP. Human Kallikrein 8 Protein Is a Favorable Prognostic Marker in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2006. 12(5), 1487-93
 25. Babita K, Rashmi B, Feruza D. Evaluation of the Pyruvate Kinase isoenzyme tumor (Tu M2-PK) as a tumor marker for cervical carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res* 2004; 193(3):193-196
 26. Ahmed AS, Dew T, Lawton FG, Papadopoulos AJ, Devaja O, Raju KS, Sherwood RA. Tumor M2-PK as a predictor of surgical outcome in ovarian cancer, a prospective cohort study. *Eur J. Gynaecol. Oncol* 2007;. 28(2), 103-8
 27. Ahmed AS, Dew T, Lawton FG, Papadopoulos AJ, Devaja O, Raju KS, Sherwood RA. M2-PK as a novel marker in ovarian cancer. A prospective cohort study. *Eur. J. Gynaecol. Oncol* 2007; 28(2), 83-8
 28. Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude GF. Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84, 6379-6383
 29. Sawada K, Radjabi AR, Shinomiya N, Kistner E, Kenny H, Becker AR, Turkyilmaz MA, Salgia R, Yamada SD, Vande Woude GF, Tretiakova MS, Lengyel E. c-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion. *Cancer Res* 2007; 67(4), 1670-9
 30. Ayhan A, Ertunc D, Tok EC, Ayhan A. Expression of the c-Met in advanced epithelial ovarian cancer and its prognostic significance. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2005; 15(4), 618-23
 31. Maggiora P, Lorenzato A, Fracchioli S, Costa B, Castagnaro M, Arisio R, Katsaros D, Massobrio M, Comoglio PM, Flavia Di Renzo M. The RON and MET oncogenes are co-expressed in human ovarian carcinomas and cooperate in activating invasiveness. *Exp Cell Res* 2003; 288(2), 382-9
 32. Albin A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Canc* 2007; 7, 139-147
 33. Overall CM, Kleinfeld O. Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Canc* 2006; 6, 227-239
 34. Kamat AA, Fletcher M, Gruman LM, Mueller P, Lopez A, Landen CLN Jr, Han L, Gershenson DM, Sood AK. The Clinical Relevance of Stromal Matrix Metalloproteinase Expression in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(6), 1707-14
 35. Thaker PH, Deavers M, Celestino J, Thornton A, Fletcher MS, Landen CN, Kinch MS, Kiener PA, Sood AK. EphA2 Expression Is Associated with Aggressive Features in Ovarian Carcinoma. *Clin Canc Res* 2004; 10, 5145-5150
 36. Lin YG, Han LY, Kamat AA, Merritt WM, Landen CN, Deavers MT, Fletcher MS, Urbauer DL, Kinch MS, Sood AK. EphA2 Overexpression Is Associated With Angiogenesis in Ovarian Cancer. *Cancer* 2007;109, 332-40
 37. Rodabaugh KJ, Mhawech-Fauceglia, P, Groth J, Lele S, Sood AK. Prostate-derived Ets Factor Is Overexpressed in Serous Epithelial Ovarian Tumors. *Int J Gynecol Pathol* 2007; 26(1), 10-5
 38. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420, 19-26
 39. Lin W, Karin M. A cytokine-mediated link

- between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Inv* 2007; 117(5), 1175-83
40. Ripley D, Shoup B, Majewski A, Chegini N. Differential expression of interleukins IL-13 and IL-15 in normal ovarian tissue and ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* 2004; 92, 761-768
41. Kioi M, Kawakami M, Shimamura T, Husain SR, Puri RK. Interleukin-13 receptor $\alpha 2$ chain A potential biomarker and molecular target for ovarian cancer therapy *Cancer* 2006;107, 1407-18
42. Agarwal R, Whang DH, Alvero AB, Visintin I, Lai Y, Segal EA, Schwartz P, Ward D, Rutherford T, Mor G. Macrophage migration inhibitory factor expression in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196 1-5
43. Hagemann T, Wilson J, Kulbe H, Li NF, Leinster DA, Charles K, Klemm F, Pukrop T, Binder C, Balkwill FR. Macrophages Induce Invasiveness of Epithelial Cancer Cells Via NF- κ B and JNK1. *J Imm* 2005; 175, 1197-1205
44. Lim R, Ahmed N, Borregaard N, Riley C, Wafai R, Thompson EW, Quinn MA, Rice GE. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) an early-screening biomarker for ovarian cancer: NGAL is associated with epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition. *Int. J. Cancer* 2007; 120, 2426-2434
45. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Ann Rev Immunol* 2004; 22, 329-60
46. Surowiak P, Materna V, Maciejczyk A, Kaplanko I, Spaczynski M, Diemel M, Lage H, Zabel M. CD46 expression is indicative of shorter relapse-free survival for ovarian cancer patients. *Anticancer Res* 2006. 26(6C), 4943-8
47. Nakashima M, Sonoda K, Watanabe T. Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat. Med* 1999; 5(8), 938-42
48. Leelawat K, Watanabe T, Nakajima M, Tujinda S, Suthipintawong C, Leardkamolkarn V. Upregulation of tumour associated antigen RCAS1 is implicated in high stages of colorectal cancer. *J Clin Path* 2003; 56, 764-768
49. Oshikiri T, Hida Y, Miyamoto M, Hashida H, Katoh K, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoaka K, Shinohara T, Itoh T, Kondo S, Katoh H. RCAS1 as a tumour progression marker: an independent negative prognostic factor in gallbladder cancer. *Br J Cancer* 2001; 85, 1922-1927
50. Sonoda K, Miyamoto S, Hirakawa T, Yagi H, Yotsumoto F, Nakashima M, Watanabe T, Nakano H. Clinical significance of RCAS1 as a biomarker of uterine cancer. *Gynecol Oncol* 2006; 103, 924-931
51. Jensen OL. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:391-403
52. Srinivas PR, Verma M, Zhao Y, Srivastava S. Proteomics for Cancer Biomarker Discovery. *Clin Chem* 2002; 48(8):1160-1169
53. Yan XD, Pan LY, Yuan Y, Lang JH, Mao N. Identification of Platinum-Resistance Associated Proteins through Proteomic Analysis of Human Ovarian Cancer Cells and Their Platinum-Resistant Sublines. *J. Proteome Res* 2007; 6(2), 772-80
54. Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, Li J, Sokoll LJ, Rai AJ et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2004 Aug 15;64(16):5882-90
55. Brown Jones M, Krutzsch H, Shu H, Zhao Y, Liotta LA, Kohn EC, Petricoin EF III. Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* 2002; 2, 76-84
56. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomics patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359(9306):572-577
57. Ye B, Cramer DW, Skates SJ, Gygi SP, Pratomo V, Fu L, Horick NK, Licklider, Schorge JO, Berkowitz RS, Mok SC. Haptoglobin-Subunit A as Potential Serum Biomarker in Ovarian Cancer: Identification and Characterization Using Proteomic Profiling and Mass Spectrometry. *Clin Canc Res* 2003; 9:2904-2911
58. Mor G, Visintin I, Lai Y, Zhao H, Schwartz P, Rutherford T, Yue L, Bray-Ward P, Ward DC. Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *PNAS* 2005; 102(21), 7677-7682