

“L’APOPTOSI CELLULARE NEI CARCINOMI DI EPITELIO TRANSIZIONALE DELLA VESCICA (TCC) Revisione della letteratura e prospettive di studio”

P. Gontero*, G. Casetta, G.H. Muir#

*Clinica Urologica, Università di Novara, Direttore: prof. B. Frea

Clinica Urologica 1, Università di Torino, Direttore: prof. A. Tizzani

Dept. of Urology, King’s College Hospital, London

Riassunto

L’apoptosi è un serie ordinata di cambiamenti morfologici attraverso cui una cellula viene eliminata dall’organismo. Anche le cellule tumorali possono andare incontro a questo processo di “morte cellulare”. Si ritiene che la capacità di apoptosi in un tumore ne condizioni in qualche modo l’aggressività neoplastica. È noto infatti che alcuni chemioterapici esplicano la loro azione citoreducitiva innescando l’apoptosi, come pure è stato osservato che alcuni tumori sono restii ad andare incontro ad apoptosi. Le ricerche di questi ultimi anni hanno messo in luce, sebbene ancora lacunosamente, l’intricato meccanismo con cui l’apoptosi viene regolata a livello genico. Si è così aperto un vasto orizzonte di prospettive miranti a chiarire gli eventi molecolari alla base delle alterazioni di questo processo nei tumori e la loro connessione con la prognosi e la chemioresistenza. Queste problematiche ben si applicano al carcinoma di epitelio transizionale della vescica (TCC), dove il concetto di chemioresistenza è stato ipotizzato soprattutto per spiegare l’apparente non responsività alle chemioterapie endovesicali. La recidiva neoplastica è stata da alcuni autori correlata con lo sbilanciamento nell’espressione di alcuni oncogeni anti-apoptotici (es. bcl-2) e proapoptotici (es. bax). La presente trattazione illustra gli obiettivi di alcuni studi pilota che sono stati intrapresi con lo scopo di approfondire l’interrelazione tra effetto chemioterapico della MMC ed apoptosi.

Summary

Apoptosis consists in a series of morphological changes through which a cell undergoes death. This process involves tumoural cells as well. The ability of apoptosis may account for different degrees of cancer aggressiveness. It is in fact well recognized that several chemotherapeutic agents trigger apoptosis in target cells and that this mechanism is impaired in certain tumours. Recent studies have highlighted a complex pathway underlying the genomic control of apoptosis. New research projects have been therefore set up to better clarify a possible relationship between tumour chemoresistance and apoptosis impairment. This field of interests thoroughly involve transitional cell carcinoma (TCC), in which chemoresistance has been claimed to account for the apparent lack of responsiveness to intravesical chemotherapy in few superficial tumours. Tumour recurrence has been related to an imbalanced apoptotic genes expression, such as a decreased bax/bcl-2 oncogenes ratio. The present report shows the aims of a series of pilot studies we carried out to better understand the interrelationship between chemotherapeutic properties of MMC and apoptosis in TCCs.

Introduzione

La morte cellulare è un evento comune che si verifica sia nei tessuti sani che in quelli patologici. Nell'embrione umano una morte cellulare geneticamente controllata avviene in momenti precisi dell'organogenesi, mentre nell'individuo adulto l'eliminazione di cellule deve tenere il passo con la proliferazione nei tessuti in rapido rinnovamento (ad esempio il midollo osseo, la cute...), pena un'anomala espansione cellulare.

Le cellule possono andare incontro a morte secondo due meccanismi ben distinti tra loro: la necrosi e l'apoptosi. Con il primo si intendono i cambiamenti morfologici che accompagnano la distruzione di cellule colpite da un evento patologico quale un'ischemia o da un qualsiasi agente fisico in grado di provocare un trauma sulla cellula. L'apoptosi è invece un processo fisiologico di morte cellulare "controllata", essenziale per il mantenimento dell'omeostasi tissutale.

La constatazione che l'apoptosi si verificava anche nei tumori è un'osservazione non nuova. Già da tempo era stato suggerito che l'apoptosi poteva rendere conto della ridotta crescita tumorale rispetto alla cinetica proliferativa del tumore (1). Divenne ben presto evidente come diverse modalità di trattamento antineoplastico quali gli agenti citotossici, la radioterapia e la deprivazione ormonale avevano la proprietà di innescare questo processo (2). Come facilmente ipotizzabile però, in alcune forme neoplastiche questo meccanismo di autoregolazione risultava seriamente compromesso, lasciando così campo libero ad una spropositata amplificazione tumorale.

Le ricerche di questi ultimi anni hanno messo in luce, sebbene ancora lacunosamente, l'intricato meccanismo con cui l'apoptosi viene regolata a livello genico. Si è così aperto un vasto orizzonte di prospettive miranti a chiarire gli eventi molecolari alla base delle alterazioni di questo processo nei tumori e la loro connessione con la prognosi e la chemioresistenza.

Morfologia dell'apoptosi

L'apoptosi è un serie ordinata di cambiamenti morfologici attraverso cui una cellula viene eliminata dall'organismo. A livello ultrastrutturale possiamo semplificare il processo in 3 fasi principali come schematizzato nella figura 1:

1. **condensazione della cromatina**: la cromatina si aggrega in masse e si ha una riduzione del volume citoplasmatico ed una frammentazione della membrana nucleare
2. **rottura del nucleo in diversi frammenti**, circondati ciascuno da un involucro di membrana a doppio strato; questi corpuscoli, denominati corpi apoptotici, vengono rilasciati dalla cellula in via di distruzione. Il presupposto biochimico di questa fase è rappresentato dal clivaggio del DNA in frammenti ad alto peso molecolare da parte di endonucleasi
3. rapida **fagocitosi dei corpi apoptotici** da parte delle cellule limitrofe e loro disintegrazione all'interno dei lisosomi (2).

Tra l'innescio del processo e la formazione dei corpi apoptotici intercorrono di solito solo pochi minuti. Pertanto l'aspetto della cellula con le tipiche gemmazioni di membrana si osserva raramente nelle sezioni tissutali. La maggior parte dei corpi apoptotici è di dimensioni tali da rendersi difficilmente visibile al microscopio ottico (3).

Differenziazione tra apoptosi e necrosi

La distinzione tra apoptosi e necrosi e' inequivocabile al microscopio elettronico e con un po' di pratica puo' essere effettuata anche al microscopio ottico. Nelle fasi iniziali della necrosi si assiste di solito al rigonfiamento della cellula (nell'apoptosi vi e' al contrario una coartazione del citoplasma). La dilatazione degli organuli ed il rigonfiamento dei mitocondri sono altresì assenti nell'apoptosi. Infine la necrosi, contrariamente all'apoptosi, si accompagna ad una cospicua reazione infiammatoria. Il processo necrotico di solito coinvolge foci di piu' cellule, mentre l'apoptosi riguarda singole cellule sparse nella sezione tissutale.

Gli eventi biochimici alla base dell'apoptosi

Indipendentemente da come l'apoptosi venga innescata, un tipo particolare di clivaggio del DNA interviene quale evento biochimico iniziale e comune a tutte le cellule, responsabile dei cambiamenti morfologici nucleari. Nelle cellule eucariotiche la doppia elica di DNA in ciascun cromosoma e' "compressa" in un modo finemente ordinato. L'unita' fondamentale di questo "impacchettamento" e' il nucleosoma, un ottamero istonico che forma una specie di involucro attorno ad una quantita' costante di DNA di circa 200 paia di basi. Nelle cellule apoptotiche, i punti di connessione tra nucleosomi vengono clivati verosimilmente ad opera di endonucleasi lisosomiali con la formazione di frammenti di DNA di circa 200 paia di basi o di un multiplo, che migrano elettroforeticamente su gel producendo un tipico aspetto "a scala" (4).

Un'altra caratteristica comune al processo apoptotico sembra essere l'aumento della concentrazione di Ca^{2+} nel citosol, probabilmente coinvolto nell'attivazione delle endonucleasi e di altre proteine che degradano gli elementi del citoscheletro producendo così le modificazioni del profilo cellulare che si osservano durante il rilascio dei corpi apoptotici (5).

I meccanismi molecolari alla base di questi eventi non sono ancora stati esattamente definiti. La constatazione che alcune terapie quali gli agenti chemioterapici ed i linfociti citotossici innescavano l'apoptosi sulle cellule bersaglio (6) ha spinto ad ipotizzare l'esistenza di recettori di membrana in grado di attivare o disattivare il fenomeno. La figura 2 illustra un modello di cascata molecolare che coinvolge il piu' noto di questi recettori, denominato inizialmente **FAS** e poi in seguito **Apo I** (o CD 95) (7). FAS appartiene alla stessa famiglia dell'EGFr ed e' espresso praticamente in tutte le cellule in un'unica isoforma (8). Il suo ligante invece e' espresso solo da poche cellule, tra cui le cellule dotate di attivita' citotossica oppure si ritrova in circolo come molecola libera.

La catena di reazioni che si svolge a valle del recettore FAS non e' ancora interamente compresa. Un punto cruciale sembra essere costituito dall'attivazione di un enzima della famiglia delle cistine-proteasi denominato **ICE** (interleukin-1 β -converting enzyme) per la sua nota funzione di attivare la pro IL-1 β in IL-1 β . ICE e' codificata da un gene della famiglia "ced" (cell death abnormal) detto **ced-3**, scoperto per la sua funzione essenziale nell'attivare la morte cellulare durante l'organogenesi dell'elminta *C. elegans*. Mutazioni che inattivano ced-3 si traducono nella sopravvivenza (ossia nella soppressione della fisiologica apoptosi) di tutte le cellule embrionali di *C. elegans*. E' possibile che il ruolo di ICE nella catena apoptotica consista nell'attivazione per proteolisi di un altro enzima, la pro-cisteina-proteasi **CPP32** o prICE (protein resembling ICE), clivandolo in due subunita' attive che prendono il nome di **apopaina**.

Quest'ultimo esplica a sua volta un'azione di clivaggio a carico dell'enzima riparatore del DNA poli (ADP-ribosio) polimerasi (**PARP**). PARP aumenta in modo cospicuo durante la frammentazione del DNA in corso di apoptosi, ma l'apoptina ne previene la funzione riparatrice clivandone il sito di legame per il DNA, così che il processo apoptotico può proseguire il suo corso (9).

I mitocondri, deputati fisiologicamente alla produzione di energia mediante la catena della fosforilazione ossidativa, sono considerati gli organuli effettori dell'apoptosi. Prova ne sia il fatto che, bloccando chimicamente la fosforilazione ossidativa, si induce l'apoptosi: non a caso i più potenti agenti antiapoptotici oggi conosciuti, le proteine bcl-2, sono localizzate proprio sulla membrana mitocondriale. Come il segnale proapoptotico venga trasdotto dalla membrana cellulare al mitocondrio resta ancora da chiarire. E' possibile che il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa sia mediato dall'aumento del calcio nel citosol che ne altererebbe la permeabilità di membrana, oppure che esistano altre vie biochimiche di trasduzione del segnale al mitocondrio (10).

L'importanza dell'apoptosi in oncologia

Apoptosi e proliferazione cellulare sono due processi intimamente correlati, in quanto dalla loro interrelazione dipende lo sviluppo ed il mantenimento dei tessuti normali. Il curioso parallelismo morfologico che caratterizza le fasi iniziali dell'apoptosi e della mitosi, quali, ad esempio, la condensazione della cromatina e la rottura della membrana nucleare, ne è una conferma (2). La crescita di un tumore e con essa l'immortalizzazione dei cloni neoplastici saranno espressione diretta sia di un incremento proliferativo che dell'iniezione del meccanismo di morte cellulare.

L'apoptosi può riscontrarsi virtualmente in tutti le neoplasie maligne (11). Questa osservazione può spiegare in parte la disparità tra il tasso di crescita tumorale "osservato" e quello che ci si aspetterebbe dai calcoli sulla cinetica proliferativa di un dato tumore.

Perché le cellule tumorali vadano incontro ad apoptosi non è chiaro. La mancanza di fattori di crescita locali o l'attività di linfociti citotossici (che, lo ricordiamo, contengono un ligando per il recettore Apo-1) potrebbero esserne una spiegazione. Si può immaginare l'apoptosi come un estremo tentativo della cellula di ripristinare il controllo su se stessa visto che il fenomeno è tanto più spiccato quanto più piccola è la lesione tumorale.

Gli studi sull'apoptosi tumorale si sono sviluppati in questi ultimi anni proprio alla luce di queste constatazioni ed hanno portato alla scoperta di alcuni "geni", che anche in questo caso possiamo definire "oncogeni", in grado di modularla.

Regolazione oncogenica dell'apoptosi

Tutte le proteine, più o meno note, che abbiamo visto mediare il segnale apoptotico in seguito alla stimolazione del recettore FAS, possono essere ascritte alla serie ormai numerosa degli oncogeni. Esistono nella cellula normale altri sistemi in grado di modulare l'evento apoptotico. Tra questi spiccano il gene soppressore di tumore p53 e l'oncogene c-myc, entrambi attivamente coinvolti nel controllo della proliferazione. Infine, una nuova serie di geni, specificamente implicati nella regolazione dell'apoptosi, è venuta alla ribalta negli ultimi anni.

Bcl-2

E' il prototipo di una famiglia di geni regolatori dell'apoptosi. L'acronimo significa "B-cell lymphoma/leukaemia-2 gene" poiche' fu scoperto essere iperespresso nella leucemia omonima in seguito ad una traslocazione. La proteina bcl-2 fu inizialmente definita come "fattore di sopravvivenza", in quanto le cellule linfoidi che la iperesprimevano riuscivano a sopravvivere alla deprivazione di fattori di crescita (12). Ben presto questo fenomeno fu chiarito come l'esito della soppressione dell'apoptosi (13). Come prevedibile, l'iperespressione della proteina in diversi tumori e' stata messa in relazione con un'augmentata resistenza agli stimoli apoptotici. Questo fatto potrebbe per esempio contribuire all'accumulo di mutazioni in cellule che sarebbero fisiologicamente destinate ad essere eliminate (14).

La proteina bcl-2 e' una molecola di 25-26 Kda associata alla membrana nucleare e mitocondriale, due siti intracellulari ricchi di radicali liberi che possono innescare l'autodistruzione cellulare. Bcl-2 fa probabilmente parte di una catena antiossidante in grado di agire come un eliminatore di radicali liberi (9).

Bax

E' una proteina di 21 Kda che fa sempre parte della famiglia di bcl-2, con una considerevole omologia a quest'ultima. La sua funzione e' quella di inibire bcl-2 attraverso la formazione di complessi bcl-2/bax (15). Quando bcl-2 e' in eccesso, omodimeri di bcl-2 predominano e le cellule sembrano essere protette dal rischio di apoptosi, mentre se prevalgono gli omodimeri di bax, le cellule divengono suscettibili di morte programmata (16).

Bcl-x

E' un altro gene correlato a bcl-2. Ne sono sinora noti 2 differenti mRNA: **bcl-x_L**, quello di lunghezza maggiore, che mostra azione sinergica a bcl-2 nel prevenire l'apoptosi e **bcl-x_S**, la cui proteina inibisce la capacita' di bcl-2 di promuovere l'apoptosi (17).

Bak

Questa proteina, recentemente identificata per la sua omologia con bcl-2, e' in grado di promuovere la morte cellulare probabilmente per interazione diretta con le proteine della "sopravvivenza" bcl-2 e bcl-x (9).

Bag-1

E' una proteina multifunzionale in grado di bloccare l'apoptosi agendo in sinergia con bcl-2 (18). Ne esistono 3 isoforme umane. Studi immunoistochimici hanno dimostrato che l'immunoreattivita' per bag-1 si localizza nel citosol e nel nucleo. Elevati livelli di bag-1 sono stati riscontrati in diversi tumori umani (19).

c-myc

Il riscontro di elevati livelli di espressione di c-myc in concomitanza con un'augmentata apoptosi (20) potrebbe sembrare paradossale visto che c-myc e' noto per la sua proprieta' di stimolare la proliferazione. Questa osservazione ha indotto a ritenere che apoptosi e mitosi condividano gli stessi segnali stimolatori. Studi sperimentali su linee cellulari che iperesprimono c-myc hanno dimostrato che questo oncogene nucleare induce la proliferazione in presenza di fattori di crescita, mentre la deprivazione di questi ultimi si accompagna ad una elevata induzione apoptotica nelle stesse cellule (21). L'effetto pro-apoptotico di c-myc viene prevenuto dalla iperespressione di bcl-2 (21).

p53

La p53, dopo aver arrestato il ciclo cellulare, e' in grado di indurre l'apoptosi in caso di fallimento dei meccanismi di riparazione del DNA danneggiato (22). Come questo possa

avvenire non e' conosciuto. La p53 normale e' per esempio in grado di stimolare la sintesi di bax, che, come abbiamo gia' ricordato, e' un agente pro-apoptotico. Studi in vitro hanno dimostrato che non solo mutazioni di p53 ma anche alterazioni di p21/WAF (una cinasi ciclina-dipendente indotta dalla p53) sono responsabili della resistenza delle cellule all'apoptosi (23).

Apoptosi e terapie antitumorali

Radioterapia

Le radiazioni ionizzanti, quando somministrate in piccole dosi, amplificano significativamente l'apoptosi nei tessuti normali, senza produrre necrosi. L'entita' di questo fenomeno in un tumore potrebbe essere proporzionale alla sua radiocurabilita'(24).

Il principale responsabile pare essere la p53, che, se in grado di funzionare normalmente, si accumula nelle cellule tumorali in cui vi e' stato un danno genomico radio-indotto ed innesca la morte cellulare (25).

Chemioterapia

Diverse sostanze antitumorali, come ad esempio il cisplatino, si sono dimostrate dei potenti stimolatori dell'apoptosi nelle cellule in rapida proliferazione (26; 27). In questo modo la chemioresistenza potrebbe essere attribuita all'alterazione funzionale delle vie di induzione e di amplificazione dell'apoptosi. L'iperespressione di proteine anti-apoptotiche (bcl-2, bcl-x_L, bag1, ecc.) e' stata messa in relazione ad un'aumentata resistenza agli effetti pro-apoptotici di alcuni chemioterapici (6).

Marcatori dell'apoptosi nei TCC

Indice apoptotico (IA)

Premessa

Diversi studi hanno dimostrato che la determinazione delle cellule apoptotiche mediante microscopio ottico fornisce una stima abbastanza attendibile del processo apoptotico in un dato tumore (28; 29)

Metodi di determinazione

Il conteggio delle cellule apoptotiche uroteliali puo' essere effettuato su sezioni colorate con ematossilina ed eosina ad un ingrandimento 600 X (30).

I criteri morfologici per il riconoscimento delle cellule coinvolte nell'apoptosi possono essere riassunti come segue (31):

1. cellule con marcata condensazione della cromatina e del citoplasma
2. frammenti citoplasmatici contenenti cromatina condensata, intensamente eosinofili
3. corpi apoptotici, consistenti di frammenti cromatinici intra- od extra-cellulari purché di dimensioni inferiori ai 2 µn.

Come per le mitosi, anche in questo caso e' possibile calcolare l'indice di apoptosi (IA). Due metodi sono stati descritti per quanto riguarda le cellule uroteliali:

1. Il primo metodo esprime l'IA come il rapporto tra il numero di nuclei apoptotici per campo microscopico ed il numero totale di cellule del campo.
2. Il secondo invece prevede uno stratagemma per abbreviare i tempi di conteggio del numero totale di cellule. Ciascun campo microscopico viene suddiviso in 6 rettangoli

identici. Vengono contate le cellule di un solo rettangolo e moltiplicate per il numero di rettangoli occupati almeno da un 50% di cellule.

I dati ottenuti con entrambe le metodiche sono risultati significativamente correlati tra di loro (32).

Valore prognostico

Lipponen (30) ha riportato i primi dati sull'IA in 400 carcinomi vescicali, dimostrando un significativo incremento dell'indice con la progressione di stadio e di grado. L'IA e' altresì in grado di predire in modo indipendente il tempo di recidiva nei Ta e T1 ma non la sopravvivenza nell'intera coorte. Allo stesso modo King e coll. (33) rilevano un IA significativamente piu' basso nei tumori ben differenziati rispetto a quelli scarsamente differenziati, mentre la differenza non raggiunge la soglia di significativita' per la variabile stadio. Risulta assai arduo poter accettare che un meccanismo potenzialmente "protettivo" in senso antineoplastico si riveli poi essere in pratica un indicatore di prognosi sfavorevole. La correlazione diretta, ma non significativa, dell'IA con la proliferazione tumorale (33) trova forse una spiegazione nel fatto che l'aumentato turnover cellulare stimolerebbe la morte cellulare quale estremo tentativo fallimentare di controllo. Pertanto l'incremento dell'IA nei tumori a cattiva prognosi rispetto a quelli superficiali potrebbe essere largamente inferiore a quello che si avrebbe in condizioni normali.

Bcl-2

La disponibilita' di anticorpi monoclonali anti bcl-2 ha reso possibile lo studio dell'immunoreattivita' di questo marcatore anche nei TCC. La positività per bcl-2 nell'urotelio normale e' assente (34) oppure confinata esclusivamente agli strati epiteliali basali nel 68% dei casi (35). Quest'ultima sembrerebbe suggerire un ruolo del bcl-2 nella regolazione del potenziale di crescita dell'epitelio transizionale non neoplastico. La positività "non basale" (cioe' diffusa agli strati epiteliali superiori) nei TCC e' risultata lieve nel 20% ed intensa nel 13% secondo Lipponen (35); altri autori utilizzano un cut-off del 20%, riscontrando una positività del 24% in tumori vescicali invasivi (36).

La tabella 1 illustra i risultati dei principali studi sinora pubblicati sul ruolo prognostico di bcl-2 nei tumori vescicali. Se la correlazione di questo marcatore con l'istologia tumorale sembra indiscutibile, il suo significato prognostico e' alquanto dubbio.

Altrettanto controverso e' il significato dell'espressione immunohistochimica sincrona di p53 e di bcl-2 (36). Secondo Liukkonen (37) l'utilizzo combinato dei due marcatori aumenterebbe la correlazione con i fattori prognostici tradizionali. Altri autori puntualizzano invece l'esistenza di una correlazione inversa tra p53 e bcl-2 (38).

In uno studio pilota condotto dal nostro gruppo su 23 TCC vescicali di prima diagnosi e di stadio Ta-T1/G2, tutti sottoposti a ciclo annuale con MMC endovesicale, non e' stato possibile correlare l'evento recidiva entro 1 anno (12/23) con l'immunopositività per bcl-2 che si e' rivelata essere un evento alquanto infrequente (3/12 pazienti recidivati, 0/11 pazienti non recidivati), ne' con l'iperespressione di p53 (4/12 pazienti recidivati e 5/12 pazienti non recidivati) (dati non pubblicati).

Bax

Contrariamente a bcl-2, la proteina bax risulta espressa immunohistochimicamente solo negli strati epiteliali superficiali dell'urotelio normale (39).

Gazzaniga e coll. (16) hanno studiato il rapporto dell'espressione di bcl-2/bax a livello di RNA in 37 TCC di stadio inferiore al T2. Un pattern molecolare caratterizzato da un rapporto bcl-2/bax inferiore ad uno (quindi con uno sbilanciamento in senso eccitatorio del meccanismo apoptotico) correla significativamente con un piu' elevato intervallo libero da recidiva rispetto alla situazione inversa ($bcl-2/bax < di 1$). Il rapporto bcl-2/bax si e' dimostrato altresì un valido marcatore indipendente da grado e stadio nel predire la recidiva in un sottogruppo di tumori superficiali ed a basso grado.

Il significativo valore predittivo del rapporto bcl-2/bax (indagato con la tecnica del Western Blotting) sulla recidiva neoplastica dopo trattamento endovesicale con mitomicina-C, viene confermato da un recentissimo studio di Ye e coll. (40). In tutti i pazienti andati incontro a recidiva entro 1 anno dalla resezione (14 su 43) era presente un rapporto bcl-2/bax $> di 1$ oppure una mutazione del gene p53. Al contrario, nessuna recidiva ad un anno era presente in 17 pazienti con p53 normale e $bcl-2/bax < di 1$.

Prospettive di studio sull'apoptosi negli uroteliomi

Gli studi sinora prodotti sull'apoptosi nei TCC hanno fornito risultati di scarsa rilevanza clinica. Come abbiamo visto, l'apoptosi appare essere un processo soggetto ad un intricato controllo "multigenico". Riporre tutte le speranze nel valore prognostico di un singolo oncogene, come e' stato fatto con bcl-2, espone al rischio di spiacevoli delusioni, come effettivamente e' accaduto. Del significato di alcuni inibitori dell'apoptosi quali le proteine oncogeniche bcl-x_L e bag-1, esiste per il momento solo menzione in alcuni atti congressuali. L'ipotesi di un alterato meccanismo di apoptosi alla base della chemioresistenza per le sostanze citostatiche da tempo utilizzate nelle neoplasie superficiali e' un argomento affascinante e tuttora indimostrato. E' molto probabile che l'azione citotossica della MMC si espliciti attraverso l'attivazione della catena apoptotica come osservato da Kelly e coll. (32). L'efficacia della somministrazione endovesicale di MMC ed epirubicina in termini di prevenzione delle recidive e' indiscussa. La durata del trattamento chemio-profilattico e' invece tuttora argomento di vivaci contrasti. Ali-El-Dein e coll. (41) hanno recentemente osservato come instillazioni ripetute per un anno non offrano vantaggi significativi rispetto ad una dose singola somministrata immediatamente dopo la resezione transuretrale. Nulla si sa invece di quella quota di tumori che recidivano a discapito dei cicli terapeutici.

La comprensione dei meccanismi molecolari che stanno alla base dell'apparente non responsivita' al trattamento citostatico endovesicale da parte di alcuni TCC permetterebbe una migliore selezione dei pazienti da trattare oltre che del protocollo terapeutico da applicare.

I risultati preliminari di un nostro studio pilota sull'efficacia in vitro della MMC, hanno rivelato come la dose farmacologica in grado di uccidere il 50% delle cellule di TCC (LC50) incubate con dosi scalari di questo chemioterapico sia estremamente variabile, fino ad un fattore di 1:300 (range 0,342-123,5 μM). L'esperimento, condotto su culture cellulari di 26 campioni di tumore vescicale ottenuti per mezzo di TURB, utilizza il metodo della bioluminescenza per rivelare l'ATP cellulare ed ha dimostrato che la chemiosensibilita' degli uroteliomi e' indipendente dal grado e dallo stadio patologici. In altre parole, alcuni tumori vescicali superficiali e di basso grado che correntemente noi sottoponiamo a cicli di instillazioni endovesicali, presentano un certo grado di "resistenza" alla MMC. Il passo successivo consistera' nel verificare se, a questa

osservazione “in vitro”, corrisponda un riscontro clinico, cioè se i tumori meno chemiosensibili siano quelli destinati a recidivare.

Parallelamente abbiamo intrapreso uno studio pilota “in vivo” sull’azione farmacologica della MMC. I pazienti riscontrati essere portatori di un’evidente lesione neoplastica vescicale all’indagine con cistoscopia flessibile, vengono sottoposti nella stessa seduta ad una singola instillazione endovesicale con 40 mg di MMC (previa richiesta di consenso informato). La lesione viene resecata nell’arco di 15 giorni ed i campioni tumorali inviati al patologo per l’esame istologico, la definizione dell’indice di apoptosi e l’approntamento delle reazioni immunohistochimiche per le proteine bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, p53, c-myc. Una parte del campione viene congelata in azoto liquido in vista degli studi molecolari ed infine, se la massa tumorale è sufficientemente consistente, un cm³ di tumore viene inviato in apposito terreno di coltura per lo studio di chemiosensibilità’.

Alla base di queste ricerche per il momento solo preliminari stanno la speranza di individuare un’interrelazione tra geni pro-apoptotici ed anti-apoptotici in grado di spiegare la possibile chemio-resistenza che fino ad ora rappresenta una pura osservazione clinica.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Kerr J.F.R. and Searle J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J Pathol* 1972; 107: 41-44.
- 2) Kerr J.F.R., Winterford C.M., Harmon B.V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73 (8): 2013-2026.
- 3) Bursch W., Paffe S., Putz B., Barthel G., Schulte-Hermann R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 1990; 11: 847-853.
- 4) McConkey D.J., Aguilar-Santelises M., Hartzell P., Eriksson I., Mellstedt H., Orrenius S. Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *J Immunol* 1991; 146: 1072-1076.
- 5) Alison M.R. and Sarraf C.E. Apoptosis: regulation and relevance to toxicology. *Hum Exp Toxicol* 1995; 14: 234-237.
- 6) Hickman J.A. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11: 121-139.
- 7) Itoh N., Yonehara S., Ishii A., Yonehara M., Mizushima S-I., Sameshima M. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen FAS can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-243.
- 8) Oehm A., Behrmann I., Falk W., Pawlita M., Maie G., Klas C. Purification and molecular cloning of the Apo-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily: sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 1992; 267: 10709-10715.
- 9) Alison M. R., Sarraf C. E. *Understanding cancer*. Cambridge University Press. 1997.
- 10) Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J-L., Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 1995; 9: 1277-1287.
- 11) Harmon B.V. An ultrastructural study of spontaneous cell death in a mouse mastocytoma with particular reference to dark cells. *J Pathol* 1987; 153: 345-355.
- 12) Vaux D.L., Cory S., Adams J.M. Bcl-2 genes promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335: 440-442.
- 13) Hockenbery D., Nunez G., Milliman C., Schreiber R.D., Korsmeyer S.J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334-336.
- 14) Collins M.K.L., Marvel J., Malde P., Lopez-Rivas A. Interleukin 3 protects murine bone marrow cells from apoptosis induced by DNA damaging agents. *J Exp Med* 1992; 176: 1043-1051.
- 15) Oltvai Z., Milliman C., Korsmeyer S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619.
- 16) Gazzaniga P., Gradilone A., Vercillo R., Gandini O., Silvestri I., Napolitano M., Albonici L., Vincenzoni A., Gallucci M. Bcl-2/bax mRNA expression ratio as a prognostic factor in low-grade urinary bladder cancer. *Int J Cancer* 1996; 69: 100-104.
- 17) Gazzaniga P., Gradilone A., Silvestri I., Gandini O., Giuliani L., Vincenzoni A., Gallucci M. Variable levels of bcl-2, bcl-x and bax mRNA in bladder cancer progression. *Oncol Rep* 1998; 5 (4): 901-904.

- 18) Packham G., Brimmell M., Cleveland J.L. Mammalian cells express two differently localized Bag-1 isoforms generated by alternative translation initiation. *Biochem J.* 1997; 328 (3): 807-813.
- 19) Takayama S., Krajewska S., Kitada S., Zapata J.M., Kochel K., Knee D., Scudiero D. Expression and location of Hsp 70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; 58 (14): 3116-3131.
- 20) Buttyan R., Zakeri Z., Lockshin R., Wolgemuth D. Cascade induction of c-fos, c-myc, and heat shock 70K transcripts during regression of the rat ventral prostate gland. *Mol Endocrinol* 1988; 2: 650-657.
- 21) Bissonette R.P., Echeverri F., Mahboubi A., Green D.R. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992; 359: 552-554
- 22) Shaw P., Bovey R., Tardy S., Sahli R., Sordat B., Costa J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Aca Sci USA* 1992; 89: 4495-4499.
- 23) Kawasaki T., Tomita Y., Bilim V., Takeda M., Takahashi K., Kumanishi T. Abrogation of apoptosis induced by DNA-damaging agents in human bladder cancer cell lines with p21/WAF1/CIP1 and/or p53 gene alterations. *Int J Cancer* 1996; 68 (4): 501-505.
- 24) Stephens L.C., Ang K.K., Schultheiss T.E., Milas L., Meyn R.E. Apoptosis in irradiated murine tumors. *Radiat Res* 1991; 127: 308-316.
- 25) Lowe S.W., Schmitt E.M., Smith S.W., Osborne B.A., Jacks T. P53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362: 847-849.
- 26) Barry M.A., Behnke C.A., Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 2353-2362.
- 27) Cotter T.G., Glynn J.M., Echeverri F., Green D.R. The induction of apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phases of the cell cycle. *Anticancer Res* 1992; 12: 773-780.
- 28) Huovinen R., Warri A., Collan Y. Mitotic activity, apoptosis and TRPM-2 mRNA expression in DMBA-induced rat mammary carcinoma treated with anti-estrogen toremifene. *Int J Cancer* 1993; 55: 685-691.
- 29) Hollowood K., Macartney J.C. Reduced apoptotic cell death in follicular lymphoma. *J Pathol* 1991; 163: 337-342.
- 30) Lipponen P.K., Aaltomaa S. Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *J Pathol* 1994; 173: 333-339.
- 31) Hamilton P.W., Allen D.C. Mitotic count. In Hamilton P.W. Allen D.C., eds, *Quantitative Clinical Pathology*. 1st edn. Oxford: Blackwell Science, 1995: 23-27.
- 32) Kelly J.D., Hamilton P.W., Williamson K.E., Weir H.P., McManus D.T. Validation of a rapid method to quantify apoptosis in superficial bladder cancer. *Br J Urol* 1997; 80: 927-932.
- 33) King E.D., Matteson J., Jacobs S.C., Kyprianou N. Incidence of apoptosis, cell proliferation and bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: association with tumor progression. *J Urol* 1996; 155: 316-320.
- 34) Hockenbery D.M., Zutter M., Hickey W., Nahm M. and Korsmeyer S.J. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 6961-6965.

- 35) Lipponen P.K., Aaltomaa S., Eskelinen M. Expression of the apoptosis suppressing bcl-2 protein in transitional cell bladder tumours. *Hystopathology* 1996; 28: 135-140.
- 36) Glick S.H., Howell L.P., White R.W.D. Relationship of p53 and bcl-2 to prognosis in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1996; 155: 1754-1757.
- 37) Liukkonen T.J.O., Lipponen P.K., Helle M., Jauhiainen K.E. and the Finnbladder III Group. Immunoreactivity of bcl-2, p53 and EGFr is associated with tumor stage, grade and cell proliferation in superficial bladder cancer. *Urol Res* 1997; 25: 1-8.
- 38) Shiina H., Igawa M., Urakami S., Honda S., Shirakawa H., Ishibe T. Immunohistochemical analysis of bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol* 1996; 49: 395-399.
- 39) Bilim V.N., Tomita Y., Kawasaki T., Takeda M., Takahashi K. Variable bcl-2 phenotype in benign and malignant lesions of urothelium. *Cancer Lett* 1998; 128 (1): 87-92.
- 40) Ye D., Li H., Qian S., Sun Y., Zheng J. and Ma Y. bcl-2/bax expression and p53 gene status in human bladder cancer: relationship to early recurrence with intravesical chemotherapy after resection. *J Urol* 1998; 160: 2025-2029.
- 41) Ali-El-Dein B., Nabeeh A., El-Baz M., Shamaa S., Ashamallah A. Single-dose versus multiple instillations of epirubicin as prophylaxis for recurrence after transurethral resection of pTa and pT1 transitional-cell bladder tumours: a prospective, randomized controlled study. *Br J Urol* 1997; 79: 731-735.

TABELLA 1

Autore	Casistica	Correlazione con i fattori prognostici tradizionali	Valore prognostico
King E.D., 1996	40 TCC	Valori crescenti in modo significativo con il grado, ma non con lo stadio	Nessuna correlazione con la recidiva e la sopravvivenza
Lipponen P.K., 1996	158 TCC	Correlazione significativa della positività "non basale" con il grado e lo stadio	Nei Ta-T1 l'intervallo libero da recidiva si correla in modo significativo con l'espressione di bcl-2, pur non rivelandosi una variabile indipendente
Glick S.H., 1996	41 TCC invasivi	Nessuna correlazione con il grado istologico	Nessun valore predittivo sulla mortalità
Bilim V.N., 1998	TCC dell'alta e bassa via escretrice	Significativa correlazione con il grado e lo stadio	-

Significato controverso dell'immunoreattività per la proteina bcl-2 nella prognosi dei TCC vescicali.