

**“MARCATORI GENOMICI E PROLIFERATIVI NEL CARCINOMA
D’EPITELIO TRANSIZIONALE DELLA VESCICA E DELL’ALTA
VIA ESCRETRICE.”**

**METODICHE DI DETERMINAZIONE E LORO UTILITA’ PROGNOSTICA
NELLA PRATICA CLINICA.**

Giovanni Casetta, Paolo Gontero

Patologia Urologica, Università di Torino

RINGRAZIAMENTI

- Gli Autori ringraziano per la preziosa collaborazione:
- Mr. Alex Dionysiou (King’s College Hospital, Medical Illustration Department, Londra) ed il dott. Antonio De Zan (Patologia Urologica, Università di Torino) per le tavole illustrative del testo.
 - il Prof. Giovanni Bussolati e la dott.ssa Donatella Pacchioni (Dipartimento di Oncologia Umana e Scienze Biomediche, Università di Torino) per la parte istologica ed immunoistochimica.

Torino, 1° settembre 1999

INTRODUZIONE E SCHEMA DELLA TRATTAZIONE

Il cancro può essere considerato una malattia del genoma. Il processo di cancerizzazione s'innescia allorché il DNA di una o più cellule subisce delle "modificazioni" in uno o più punti cruciali dove risiedono dei geni coinvolti direttamente od indirettamente nel controllo della proliferazione (e della differenziazione cellulare).

Alterazioni del genoma ed aumento proliferativo sono quindi intimamente correlati ed in grado di condizionare i cambiamenti fenotipici della cellula tumorale che si manifestano essenzialmente con l'immortalizzazione e con la trasformazione (che sono alterazioni della differenziazione cellulare).

L'**immortalizzazione** descrive la proprietà delle cellule neoplastiche di crescere indefinitamente grazie alla mancanza di un controllo inibitorio del ciclo proliferativo. A ciò contribuisce significativamente la perdita della capacità di apoptosi (un meccanismo fisiologico di "morte naturale" della cellula). La cellula neoplastica diviene incapace di innescare questo processo di autoannientamento finalizzato a mantenerne l'integrità genomica. I geni predisposti al controllo dell'apoptosi sono, infatti, anch'essi dei "punti caldi" suscettibili di andare incontro a mutazioni nel corso della cancerogenesi.

La **trasformazione** implica invece la perdita dei normali meccanismi atti a limitare la crescita cellulare. In questo modo la cellula cresce indipendentemente dalla presenza o meno di fattori di crescita, senza essere soggetta all'inibizione da contatto con le cellule limitrofe, fino a perdere la capacità di aderire ad esse. Il punto finale di questo individualismo cellulare è rappresentato dalla **metastatizzazione**, resa possibile dall'acquisizione della capacità di movimento.

Gli studi di biologia molecolare degli ultimi anni si sono focalizzati nell'identificare le basi genetiche della formazione tumorale. "Confrontando" il DNA tumorale con quello di una cellula fenotipicamente normale si è visto, grazie a tecniche sofisticate, che alcune alterazioni ricorrono spesso in punti (o "loci") sedi di geni che svolgono un ruolo cruciale nel controllo delle funzioni di proliferazione cellulare. Tali geni sono stati suddivisi in due categorie: proto-oncogeni e geni soppressori di tumore e saranno oggetto di discussione nel corso della trattazione. La comprensione dei meccanismi cancerogenici

e' lungi dall'essere completa: a tutt'oggi sono state descritte alterazioni a carico di almeno un centinaio di proto-oncogeni e gli studi di "transfezione" (inserimento di un proto-oncogene alterato in una cellula normale per vedere se e' in grado di trasformarla in senso neoplastico) hanno permesso di calcolare che almeno sei o sette di questi geni cruciali devono essere alterati perché si inneschi il cancro. Questo peraltro spiegherebbe in parte il lungo periodo di latenza che spesso intercorre tra esposizione ad un cancerogeno e manifestazione della malattia come pure l'elevata frequenza di tumori in età avanzata, quando cioè l'organismo ha avuto il tempo per accumulare un numero critico di alterazioni geniche. Inesorabilmente, tutti i tumori prima o poi acquisiscono una maggiore "virulenza" che noi definiamo come **progressione**, favorita essenzialmente da ulteriori alterazioni a carico di altri geni fino ad arrivare ad uno sconvolgimento totale della matassa genomica.

Il carcinoma di epitelio transizionale (TCC), che rappresenta gran parte di tutti i tumori uroteliali, non fa eccezione nella complessità delle sue basi molecolari a quanto sinora accennato in termini molto generali. Si può affermare che ogni proto-oncogene, ogni tecnica di biologia molecolare (studio dei singoli geni) o di citogenetica (studio dei cromosomi), ogni metodo di valutazione della proliferazione sia stato applicato a questo tumore con i risultati che vedremo più avanti. Basti pensare che solo nel 1997 sono comparsi nella letteratura internazionale più di 90 lavori riguardanti il gene soppressore di tumore p53 negli uroteliomi!

Questa trattazione, rivolta principalmente ad urologi ed oncologi, si prefigge tre obiettivi:

1. offrire nozioni di biologia molecolare essenziali per la comprensione di lavori scientifici che sempre più spazio hanno nella letteratura urologica
2. presentare una revisione aggiornata dei principali studi di genetica molecolare, di citogenetica, di immunoistochimica nel TCC
3. verificare se, allo stato attuale dell'arte, esistano dei "marcatori" tumorali del TCC utilizzabili nella pratica clinica.

Nel carcinoma uroteliale, come del resto in ogni tipo di tumore, un marcatore tumorale può essere valido solo nella misura in cui e' in grado di fornire informazioni sul

comportamento biologico della neoplasia tali da condizionare un approccio diagnostico/terapeutico significativamente vantaggioso in termini di sopravvivenza per l'individuo. Altro presupposto essenziale e' che l'utilità di un dato marcatore sia indipendente (cioè dia un contributo assolutamente originale) rispetto a quella di altri fattori prognostici già consolidati nella pratica clinica.

Per tale motivo nella prima parte della trattazione sarà presentata una breve descrizione dei **fattori prognostici tradizionali del TCC**, con i quali ogni presunto nuovo marcatore dovrà fare i conti prima che ne sia riconosciuta una validità clinica.

La **figura 1** schematizza i più significativi eventi del processo carcinogenetico teste' esposto, dove noi possiamo identificare tre classi di marcatori che saranno descritti in tre parti distinte della trattazione.

- **Marcatori Genomici** (parte seconda della trattazione)
- **Marcatori Proliferativi** (parte terza della trattazione)
- **Marcatori dell'Apoptosi** (parte quarta della trattazione)

L'obiettivo e' ovviamente quello di riuscire a prevedere il comportamento biologico del TCC in termini di recidiva, progressione istologica e metastatizzazione al fine di instaurare i provvedimenti terapeutici più idonei.

PARTE PRIMA

I FATTORI PROGNOSTICI TRADIZIONALI DEL TCC

INTRODUZIONE

L'approccio terapeutico al carcinoma vescicale, soprattutto superficiale, rappresenta una costante sfida per l'Urologo per la sua storia naturale assai variabile e per i differenti approcci possibili. Il carcinoma vescicale superficiale rappresenta il 75% delle neoplasie al momento della prima diagnosi e recidiva tra il 50 ed il 60% dei casi dopo la resezione transuretrale, usualmente per la formazione di nuove neoplasie. Approssimativamente il 70% dei carcinomi superficiali sono confinati alla mucosa (Ta) ed il 30% infiltrano la sottomucosa (T1). Il 10-20% dei carcinomi superficiali progredisce nel follow-up ed ovviamente la possibilità di identificare tali pazienti giustificherebbe una terapia più aggressiva; in ogni caso la disponibilità di indicatori prognostici affidabili migliorerebbe l'approccio alla malattia, l'analisi dei risultati dei trial clinici in corso e la preparazione di nuovi protocolli di terapia.

CAP. 1: CLASSIFICAZIONE DEI TCC VESCICALI

La prima classificazione formale del carcinoma vescicale risale a Jewett e Strong nel 1944. Jewett, in uno studio ormai classico del 1949, correlò la sopravvivenza dei pazienti sottoposti a cistectomia radicale all'estensione anatomica della neoplasia e dimostrò che la profondità dell'invasione del detrusore vescicale era il più importante fattore prognostico di sopravvivenza. Questi riscontri sono rilevanti oggi tanto quanto lo erano negli anni '40. La premessa base del sistema di classificazione di Jewett-Strong, ovvero che la prognosi è correlata all'estensione della malattia e, nella malattia localizzata, alla profondità dell'invasione della parete vescicale non è mai stata messa in discussione. Attualmente la classificazione più usata è quella del TNM, fondata sulla determinazione delle tre componenti classiche del sistema: T (estensione del tumore primario) N (estensione della eventuale adenopatia metastatica) e M (valutazione di eventuali lesioni metastatiche). La classificazione può essere clinica, TNM, o anatomopatologica post-chirurgica, pTNM. Nella **figura 2** sono schematizzati i due sistemi di classificazione del carcinoma vescicale.

CAP. 2: FATTORI PROGNOSTICI

Introduzione

Negli ultimi 20 anni alcuni studi epidemiologici hanno consentito una miglior conoscenza del comportamento biologico dei carcinomi vescicali superficiali. I tumori papillari Ta e T1 presentano un'incidenza di recidive variabile tra il 30% nelle neoplasie uniche ed oltre il 66% nelle neoplasie multiple. Le recidive si verificano per l'85% dei casi nel corso del primo anno di follow-up.

Negli anni molte caratteristiche anatomopatologiche e morfologiche sono state studiate come indicatori prognostici del carcinoma vescicale, ma poche hanno resistito alla verifica del tempo. Infatti, il tumore umano è un fenomeno incredibilmente complesso, i cui meccanismi variano anche tra soggetti diversi. I fattori prognostici tradizionali e consolidati del carcinoma vescicale transizionale superficiale (stadio Ta e T1), sono elencati nella **tabella 1**.

Fattori prognostici di recidiva e di progressione

Uno studio condotto da Kurth et al. ha analizzato i risultati di due protocolli EORTC che comprendevano 576 pazienti affetti da carcinoma vescicale superficiale. Il 54% dei pazienti ha presentato delle recidive, il 17% alla prima cistoscopia. L'analisi univariata e multivariata hanno identificato il grado della neoplasia e la storia di precedenti neoplasie come fattori prognostici significativi per il tempo di prima recidiva, il numero di recidive l'anno ed il tempo di progressione. Le dimensioni del tumore sono un importante fattore prognostico aggiuntivo per il tempo di prima recidiva, mentre il numero delle neoplasie rappresenta un fattore importante per il numero di recidive l'anno. Dalesio et al. hanno studiato 308 pazienti affetti da carcinoma vescicale superficiale T1 trattati con resezione transuretrale oppure resezione transuretrale con successive instillazioni con Thiotepa o VM-26. L'incidenza di recidive precedente, un diametro superiore ai 2 cm ed il numero delle neoplasie rappresentano all'analisi univariata i più importanti fattori prognostici. L'analisi multivariata, eseguita dopo gli opportuni aggiustamenti per la terapia somministrata, ha dimostrato tuttavia che il fattore

prognostico più importante è il numero di neoformazioni, seguito dall'incidenza di recidive precedente, mentre le dimensioni della neoplasia aggiungono poco alle informazioni fornite dai precedenti fattori. Questi dati sono stati confermati da Kaubish et al. su un campione più ridotto, 51 pazienti, ma più omogeneo in quanto provenienti da un'unica istituzione.

Heney et al. hanno studiato 249 pazienti con neoformazioni superficiali Ta (175) o T1 (74) sottoposti unicamente a resezione transuretrale. Il 2% delle neoplasie di grado 1, l'11% delle neoplasie di grado 2 ed il 45% delle neoplasie di grado 3 sono andate incontro a progressione in un periodo di tempo inferiore ai 24 mesi; inoltre le neoplasie di grado più basso hanno presentato un minor rischio di recidive nel follow-up. Le neoplasie di stadio Ta sono progredite nel 4% dei casi contro il 30% di quelle T1. In questo studio le dimensioni della neoplasia non rappresentano un fattore significativo.

Takashi et al. hanno seguito 264 pazienti affetti da carcinoma vescicale sia superficiale sia infiltrante per un periodo di 15 anni. Sono stati quindi valutati i diversi fattori prognostici che incidevano sulla sopravvivenza. Lo stadio della malattia rappresenta il fattore statisticamente più importante per la sopravvivenza dei pazienti, seguito dalle dimensioni della neoplasia, dalla presenza di sintomi irritativi, dall'età del paziente e infine dal grado della neoplasia.

Conclusioni simili sono state riportate da Ambati et al. che hanno valutato 468 pazienti con carcinoma vescicale di ogni stadio e grado con un follow-up minimo di 5 anni. I fattori prognostici indagati comprendono la presenza di precedenti neoformazioni, il grado, lo stadio, il sesso, il numero, le dimensioni e la conformazione (papillare o solida) del tumore ed il coinvolgimento del trigono vescicale. Lo stadio della neoplasia rappresenta, insieme al grado ed alle dimensioni, il fattore prognostico principale, sia nei pazienti con precedente storia di neoplasia vescicale, sia nei pazienti con prima diagnosi. La conformazione della neoplasia rappresenta un fattore prognostico importante nei pazienti alla prima diagnosi.

Sanchez de la Muela et al. hanno seguito per 5 anni 217 pazienti affetti da carcinoma vescicale superficiale di stadio Ta o T1. L'analisi statistica successiva ha incluso le variabili già descritte dai precedenti Autori, ovvero stadio, grado, numero e dimensioni delle neoplasie e precedente storia di neoformazioni vescicali, più altre come il tipo di

crescita tumorale, la concomitante presenza di displasia, l'infiltrato infiammatorio, il tasso annuale di recidive e l'incremento di grado e/o stadio nel follow-up. L'analisi univariata delle variabili ha dimostrato che anche la presenza di un infiltrato infiammatorio o una displasia uroteliale, insieme al tasso di recidive l'anno ed alla progressione di grado o stadio, rappresentano un fattore prognostico significativo per la sopravvivenza dei pazienti con neoformazioni superficiali.

Molto interessanti sono i risultati riportati da Parmar et al. utilizzando due studi del British Medical Council, che confrontavano schemi posologici diversi con Thiotepa e quindi Mitomicina-C. Nel primo studio sono stati arruolati 417 pazienti, nel secondo 502. I fattori prognostici sono stati valutati utilizzando come endpoint il tempo libero da recidive. L'analisi dei dati ha confermato che le dimensioni della neoplasia sono un importante fattore; infatti, neoplasie con diametro superiore ai 2,5 cm hanno statisticamente evidenziato una prognosi sfavorevole, così come importanti fattori prognostici si sono confermati il grado e lo stadio della neoplasia. Il dato più interessante è però la prognosi sfavorevole, sempre in termini di intervallo libero da recidive, dei pazienti con recidive neoplastiche alla prima cistoscopia di controllo, eseguita tre mesi dopo la resezione transuretrale. L'analisi multivariata dei dati ha confermato l'importanza del risultato della prima cistoscopia di controllo e del numero di neoplasie presenti alla diagnosi; tali fattori sono tuttavia correlati al grado, allo stadio ed alle dimensioni della neoplasia stessa. Nelle conclusioni gli Autori identificano tre gruppi di pazienti: un primo gruppo a ottima prognosi che comprende il 60% dei casi, con lesione singola e prima cistoscopia negativa, liberi da recidive a 2 anni nel 74%; un secondo gruppo, a prognosi discreta, che comprende il 30-35% dei pazienti, con neoplasie multiple alla prima diagnosi o cistoscopia positiva, liberi da recidive a 2 anni nel 44%; un terzo gruppo, pari al 5-10% dei casi, con neoplasie multiple e cistoscopia positiva, con cattiva prognosi e liberi da recidive a 2 anni solo nel 21%. Recentemente Allard et al. hanno proposto un indice prognostico costituito dalle cosiddette Caratteristiche Tumorali Sfavorevoli, CTS (ATC, Adverse Tumour Characteristics). Questi fattori sono stati studiati in un gruppo di 333 pazienti con neoformazione vescicale Ta o T1 di prima diagnosi. Sono stati identificati come caratteristiche sfavorevoli lo stadio T1, le lesioni neoplastiche multiple, il grado 2 o 3 e le dimensioni superiori ai 3 cm. Nell'esperienza degli Autori, il gruppo di

pazienti con CTS uguale a 0 ha una probabilità di essere libero da malattia a 12 mesi dell'86 e del 69% a 24 mesi, ed una percentuale di progressione pari allo 0%; al contrario i pazienti con CTS pari a 3-4 hanno una probabilità di essere liberi da malattia a 12 mesi del 30 e del 19% a 24 mesi, ed una probabilità di progressione a 35 mesi del 7%.

La coesistenza del carcinoma in situ (CIS) in associazione al tumore papillare è un importante fattore prognostico di progressione della malattia. La presenza di concomitante CIS si osserva in circa il 5-10% delle neoformazioni papillari superficiali. In uno studio di Fradet l'incidenza di progressione a 5 anni è stata del 7% in pazienti con urotelio normale, del 36% in pazienti con displasia uroteliale e dell'83% in pazienti con CIS. Quando il CIS è multiplo e causa evidenti disturbi irritativi, la progressione avviene in una percentuale di pazienti variabile dal 50 all'80%. La storia naturale del CIS è attualmente difficilmente valutabile, in quanto l'approccio immunoterapico con il BCG endovesicale ha drasticamente modificato il decorso della malattia.

Fattori prognostici di sopravvivenza

I fattori prognostici coinvolti nella sopravvivenza dei pazienti affetti da carcinoma vescicale infiltrante sono stati anch'essi oggetto di numerosi studi e sono elencati nella **tabella 2**.

In una revisione della Letteratura Paulson et al. analizzano i dati relativi a 531 pazienti sottoposti a cistectomia radicale per carcinoma vescicale infiltrante, dei quali 492 con neoplasia transizionale della vescica e 39 con neoplasia transizionale dell'uretra prostatica. I fattori prognostici studiati sono stati l'età, la razza, il sesso, lo stadio clinico, lo stadio patologico, lo stato dei linfonodi, il grado, i margini di sezione, l'infiltrazione dell'uretere o dell'uretra, il concomitante carcinoma in situ, l'infiltrazione dei dotti prostatici e la presenza di adenocarcinoma prostatico. La mortalità tumore-specifica è direttamente correlata al solo stadio patologico della malattia. La sopravvivenza è una funzione della differenziazione cellulare (più il tumore è anaplastico minore è la sopravvivenza).

Niall et al. hanno valutato l'impatto sulla sopravvivenza dell'invasione vascolare e linfatica e della morfologia, solida o papillare, della neoplasia, in 86 pazienti sottoposti a cistectomia radicale per carcinoma vescicale transizionale. Sia l'invasione vascolare, sia

la conformazione solida della neoplasia sono correlati ad una significativa riduzione della sopravvivenza. Occorre tuttavia notare che neoplasie di stadio elevato con linfadenopatia metastatica sono frequentemente associate all'invasione vascolare ed alla morfologia solida. Questi dati non sono stati completamente confermati da Mazzucchelli et al., che hanno studiato 70 pazienti sottoposti a cistectomia radicale; in questo gruppo unicamente l'infiltrazione del detrusore, e quindi lo stadio della neoplasia, influenzano la sopravvivenza dei pazienti.

Anche una più recente casistica di Wijkstrom et al. ha confermato, in 276 pazienti con neoplasia vescicale infiltrante, come il fattore prognostico più importante per la sopravvivenza e la mortalità tumore-specifica sia lo stadio della malattia. Il ruolo della positività alla palpazione bimanuale dopo resezione transuretrale è anch'esso conseguente e direttamente correlato allo stadio della malattia. La presenza di un concomitante CIS non ha alcuna influenza sulla prognosi e sulla mortalità tumore-specifica dei carcinomi vescicali infiltranti.

BIBLIOGRAFIA

Fradet Y. Markers of prognosis in superficial bladder cancer. *Seminars in Urology*, 10,1:28-38, 1992

Kaubisch S., Lum B. L., Reese J., Frehia F., Torti F. Stage T1 bladder cancer: grade is the primary determinant for risk of muscle invasion. *J. Urol.* 146,7:28-31, 1991

Heney N. M., Ahmed S., Flanagan M. J., Frable W., Corder M. P., Hafermann M. D. Hawkins I. R. Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J. Urol.* 130,12:1083-1086, 1983

Dalesio O., Schulman C. C., Sylvester R., De Pauw M., Robinson M., Denis L., Smith P.,

Viggiano G. Prognostic factors in superficial bladder tumors. A study of the European Organization for research and Treatment of Cancer: GenitoUrinary Tract Cancer Cooperative Group. *J. Urol.* 129,4:730:733, 1983

Kurth K. H., Denis L., Ten Kate F. J. W., Sylvester R., De Pauw M., Bouffieux C., Debruyne F. M. J., Pavone-Macaluso M., Oosterlick W. Prognostic factors in superficial bladder tumors. *Problems in Urology* 6,3:471-483, 1992

Narayana A. S., Loening S. A., Slymen D. J., Culp D. A. Bladder cancer: factors affecting survival. *J. Urol.* 130,7:56:59, 1983

Parmar M. K. B., Freedman L. S., Hargreave T. B., Tolley D. A. Prognostic factors for recurrence and follow-up policies in the treatment of superficial bladder cancer: report from British Medical Research Council subgroup on superficial bladder cancer (Urological Cancer Working Party). *J. Urol.* 142,8:284:288, 1989

Sanchez de la Muela P., Rosell D., Agilera L., De Castro F., Isa W., Robles J. E., Zudaire J. J., Berian J. M. Superficial Bladder Cancer: survival and prognostic factors. *Eur. Urol.* 20,184-191, 1991

Takashi M., Murase T., Mizuno S., Hamajima N., Ohno Y. Multivariate evaluation of prognostic determinants in bladder cancer patients. *Urol. Int.* 42,368:374,1987

Wijkstrom H., Norming U., Lagerkvist M., Nilsson B., Naslund I., Wiklund P. Evaluation of clinical staging before cystectomy in transitional cell bladder carcinoma. A long term follow-up of 276 consecutive patients. *Br. J. Urol.* 81,5:686-691,1998

Allard P., Bernard P., Fradet Y., Tetu B. The early clinical course of primary Ta and T1 bladder cancer. A proposed prognostic index. *Br. J. Urol.* 81,5:692-698, 1998

Paulson D. F. Critical review of radical cystectomy and indicators of prognosis. *Seminars in Urology* 11,4:205-213,1993

Heney N. M., Proppe K., Prout G. R., Pamela P. Jr., Griffin P., Shipley W. U. Invasive bladder cancer: tumor configuration, lymphatic invasion and survival. *J. Urol.* 130,11:895-897, 1983

Mazzucchelli L., Bacchi M., Studer U., Markwalder R., Sonntag R. W., Kraft R. Invasion depth is the most important prognostic factor for transitional-cell carcinoma in a prospective trial of radical cystectomy and adjuvant chemotherapy. *Int. J. Cancer* 57:15-20,1994

Jones P. A., Droller M. J. Pathways of development and progression in bladder cancer: new correlations between clinical observations and molecular mechanism. *Seminars in Urology* 11,4:177-192,1993

PARTE SECONDA

MARCATORI GENOMICI DEL TCC

CAP. 1: RICHIAMI DI GENETICA MOLECOLARE

IL DNA

Il materiale genetico della specie umana, come quello di molte altre speci, e' composto da acido desossiribonucleico (DNA). Nel 1953 Watson e Crick elaborarono il famoso modello di struttura del DNA a doppia elica intercalata. In base a questa ipotesi, poi successivamente confermata, ciascuna elica risulterebbe composta da varie combinazioni di 4 unita' distinte, le cosiddette basi nitrogene, adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timidina (T), disposte in sequenza del tutto randomizzata lungo un'ossatura costituita da desossiribosio (uno zucchero) e fosfato uniti insieme. L'unione di desossiribosio + fosfato + una delle 4 basi nitrogene costituisce un nucleotide. Piu' nucleotidi uniti assieme costituiscono un'elica di DNA. Le due eliche sono tenute insieme da specifici ponti di idrogeno che si formano tra 2 basi. Il legame avviene pero' solo tra le basi A - T e G - C rispettivamente e mai con altre combinazioni. Ciascuna elica risulta cosi' complementare all'altra.

La duplicazione del DNA, presupposto essenziale per la divisione cellulare, avviene mediante lo svolgimento delle due eliche, con la formazione di due matrici su ciascuna delle quali viene sintetizzata l'elica complementare. Si vengono cosi' a costituire 2 doppie eliche che, in base a quanto detto prima, saranno identiche tra di loro, e conterranno ciascuna una elica di DNA originale ed una neosintetizzata. La **figura 3** esemplifica quanto sinora esposto.

La sequenza di basi in una molecola di DNA rappresenta il contenuto informativo dei vari geni. Nell'uso corrente, il termine "gene" e' ristretto a quelle parti di genoma che vengono trascritte in RNA ed eventualmente poi tradotte in proteine (vedi oltre). Il contenuto di DNA di una cellula e' di gran lunga superiore a quei 100.000 geni effettivamente in funzione nel genoma umano. Il significato di questa parte in eccesso e' per lo piu' sconosciuto.

TRASCRIZIONE DEL DNA IN RNA

La struttura dell'RNA è simile a quella del DNA con 3 differenze:

1. lo zucchero della colonna portante è rappresentato dal ribosio anziché dal desossiribosio
2. la base nitrogena uracile (U) sostituisce la timidina (T)
3. si tratta di una molecola a singolo filamento (mentre il DNA è a doppio filamento)

Esistono diversi tipi di RNA nella cellula (RNA ribosomiale ed RNA transfer, entrambi coinvolti nella sintesi delle proteine), ma l'elemento che lega l'informazione contenuta in un gene ed il suo risultato finale (la proteina con una certa funzione) è rappresentato dall'RNA messaggero (mRNA).

Un enzima chiamato RNA polimerasi 2, utilizzando una delle due eliche di DNA come stampo, è in grado di produrre una molecola di mRNA che sarà l'esatta copia dell'elica di DNA complementare allo stampo (cioè quella che non è stata utilizzata per la sintesi) a parte la sostituzione di U al posto di T. L'mRNA trasporta l'informazione dal nucleo al citoplasma della cellula.

I geni di molte cellule eucariote sono normalmente interrotti da tratti di DNA definiti come introni, i quali, sebbene trascritti in mRNA, non sono poi tradotti a loro volta in proteina. Le sequenze di DNA che vengono invece regolarmente tradotte in proteine sono chiamate esoni e si trovano intervallate agli introni. Quando il DNA viene trascritto in RNA, il prodotto primario (mRNA precursore) contiene sia gli esoni che gli introni. Gli introni sono poi a loro volta eliminati con un processo noto come "splicing out" e l'mRNA maturo conterrà soltanto sequenze esoniche.

L'RNA polimerasi ha bisogno di un segnale che le indichi quale sequenza di DNA tradurre. Quest'ultimo è costituito da blocchi di DNA che si trovano di solito a monte di ciascuna sequenza genica e sono detti promotori poiché fungono da responsabili del tipo e della quantità di un determinato gene che viene tradotta (**figura 4**). Brevi sequenze genomiche costituite da 3 paia di basi nitrogene precedono immediatamente l'inizio del primo introne di ciascun gene e sono dette "codone d'inizio". Le corrispondenti tre basi che seguono la fine dell'ultimo esone di un gene sono invece definite "codone di termine" o "stop codon".

TRASCRIZIONE DELL'RNA IN PROTEINE

Una volta arrivato nel citoplasma, l'RNA funziona come substrato per la sintesi di proteine. L'intero processo è alquanto complesso e coinvolge una serie di cosiddetti RNA transfer o tRNA, speciali strutture costituite da RNA, ciascuna con il compito di trasportare uno specifico aminoacido. Il tRNA è provvisto di un sito di riconoscimento per il mRNA costituito da 3 basi (detto anticodon), il quale ha la proprietà di legarsi ad un qualsiasi codone complementare (fatto anch'esso da 3 basi) su di un mRNA.

I ribosomi, piccoli organelli citoplasmatici composti da RNA e proteine, mediano questo processo di traslazione muovendosi lungo l'mRNA e permettendo agli anticodons del tRNA di riconoscere i rispettivi codons sul mRNA (**figura 5**).

I CROMOSOMI

Il DNA cellulare è "impacchettato" a formare 46 cromosomi. Ciascuno di questi organelli è costituito da una lunga ed unica molecola di DNA contenente migliaia di geni, compressa in modo da assumere la forma che è a tutti nota.

L'ordinata distribuzione dei cromosomi in entità distinte all'interno del nucleo è visualizzabile solo quando la cellula si trova in una particolare fase del suo ciclo cellulare (la metafase). In tale momento i cromosomi, che a motivo della duplicazione del DNA hanno assunto la forma di una X, si allineano in due file e si separano sulla linea equatoriale del nucleo in vista della divisione cellulare. L'osservazione al microscopio ottico in questa fase consente spesso di riconoscerli nitidamente ed evidenziarne grossolane alterazioni.

MUTAZIONI GENOMICHE

In senso lato si intende per mutazione un qualsiasi cambiamento che coinvolga il materiale genetico o DNA. Le mutazioni possono rendersi evidenti in due strutture con ordini di grandezza molto diversi: nei singoli geni, quando coinvolgono poche basi di

DNA oppure nell'intero cromosoma quando invece interessano un grosso pezzo di DNA (per esempio l'intero braccio di un cromosoma). Queste ultime possono essere identificate con l'ausilio della microscopia ottica o con delle metodiche di laboratorio che vanno sotto il nome di tecniche citogenetiche e che saranno oggetto di discussione nella quarta parte della trattazione.

Le mutazioni che coinvolgono invece solo parti di singoli geni non sono visibili in alcun modo con gli strumenti di microscopia, ma richiedono delle particolari metodiche, le cosiddette tecniche di biologia molecolare.

La forma piu' piccola e piu' semplice di mutazione e' la sostituzione di una singola base nella doppia elica di DNA (**mutazione puntiforme**). Non tutte le sostituzioni di base portano necessariamente alla sostituzione di un aminoacido nella proteina, poiche' per esempio se la modificazione avviene nella terza base di un codone, quest'ultima di solito non e' in grado di modificare la traduzione dell'RNA in proteina. Inoltre, una mutazione che porti alla sostituzione di un aminoacido (cosiddetta "**mutazione missense**") sara' patologica solo se la sostituzione e' in grado di alterare significativamente le proprieta' della proteina. Una mutazione potenzialmente distruttiva e' quella che converte un codone specifico per un determinato aminoacido in uno stop codon (tecnicamente detta **mutazione non senso**): in tal caso il polipeptide potra' risultare seriamente troncato nella sua struttura. Viceversa potra' verificarsi una mutazione che converte uno stop codon in un codone specifico per un aminoacido, con conseguente prosecuzione della trascrizione dell'mRNA.

Mutazioni che coinvolgono le 2 coppie di basi tra loro reciprocamente complementari con cui inizia e termina ciascun introne avranno come effetto l'impedimento dello splicing dell'RNA e quindi porteranno alla formazione di un mRNA non funzionante. Infine sono state descritte mutazioni a carico delle sequenze dei promotori, con le immaginabili conseguenze disastrose per la trascrizione genica (**tabella 3**).

BIBLIOGRAFIA

Bishop MJ, Rawlings CJ (Editors) (1987). Nucleic acid and protein sequence analysis: a practical approach. IRL Press, Oxford.

Brock D.J.H. Molecular genetics for the clinician. Cambridge University Press. 1993.

CAP. 2: APPROCCIO ALLO STUDIO DEI MARCATORI GENOMICI NEL TCC

INTRODUZIONE

Abbiamo detto che il cancro si sviluppa quando una mutazione (sia essa una mutazione puntiforme piuttosto che una delezione od ancora un' amplificazione) va ad interessare uno o piu' geni "speciali", oppure quando si verificano dei riarrangiamenti a carico di interi cromosomi (traslocazioni , delezioni o duplicazioni) che pero' in ultima analisi si traducono sempre in alterazioni strutturali a carico dei succitati geni.

Tale processo, inizialmente ristretto a pochi geni ed a poche cellule, e' destinato ad amplificarsi rapidamente grazie al fatto che viene meno ogni meccanismo di controllo della proliferazione cellulare.

Parallelamente all'aumento della massa cellulare neoplastica si assiste ad un progressivo sfacelo della matassa genomica: cicli cellulari sempre piu' alterati favoriscono l'incompleta segregazione dei cromosomi e la conseguente acquisizione di cariotipi mostruosi da parte delle cellule, fino al punto in cui le alterazioni della cromatina si renderanno evidenti a livello istologico.

Per **marcatori genomici** si intende in questa trattazione l'identificazione di anomalie del DNA neoplastico, riscontrabili con una certa frequenza in un determinato istotipo tumorale, evidenziabili con una certa accuratezza mediante indagini di laboratorio standardizzate, tali quindi da costituire un potenziale fattore prognostico per una determinata neoplasia.

La ricerca di marcatori genomici nel TCC, come del resto in tutti i tumori, puo' essere schematizzata in 3 livelli: genico, cromosomico, cromatinico (**tabella 4**).

A) MARCATORI GENICI

Rappresentano il livello di ricerca metodologicamente piu' complesso ed a rigore piu' accurato, ma non necessariamente piu' valido in termini prognostici! Consentono di identificare anche una mutazione di una singola base a livello di un gene.

La trattazione di questa parte occupera' i seguenti capitoli:

Cap. 3: verranno trattati i geni responsabili del cancro, distinguendoli in oncogeni e geni soppressori di tumore.

Cap. 4: verra' fatto un cenno sulle tecniche di determinazione dei marcatori genici, distinguendole in tecniche di studio per il DNA ed RNA genico (tecniche di biologia molecolare) e tecniche di studio dei relativi prodotti proteici (tecniche di immunoistochimica).

Cap. 5: illustrera' come i prodotti dei geni del cancro si collochino all'interno della cellula in modo da interagire reciprocamente in un meccanismo di autoattivazione a cascata.

Cap. 6-9: tratteranno i principali oncogeni sinora studiati nel TCC, distinti in base alla loro localizzazione cellulare.

Cap. 10: riguardera' i principali geni soppressore di tumore studiati nei TCC, particolarmente il gene per il retinoblastoma ed il gene p53.

B) MARCATORI CROMOSOMICI

Date le dimensioni enormemente superiori di un cromosoma rispetto ad un singolo gene, questi marcatori risultano piu' facili da identificare, ma nello stesso tempo l'informazione che si ricava e' alquanto grossolana: per esempio in presenza di una costante delezione di un braccio o di un intero cromosoma in un tumore, si potra' solo ipotizzare che quella e' la sede probabile di un gene soppressore di tumore "x", senza pero' possibilita' di ricavare ulteriori informazioni relative al gene stesso a patto di non ricorrere alle tecniche di biologia molecolare.

Il **cap. 11** riguardera' le metodiche di studio delle anomalie cromosomiche, le cosiddette tecniche citogenetiche ed in particolare la "fluorescent in situ hybridization" (FISH).

Il **cap. 12** prendera' invece in considerazione le piu' frequenti alterazioni cromosomiche nei TCC.

C) MARCATORI QUANTITATIVI DEL DNA

Si propongono di attribuire un significato prognostico alla presenza di DNA in quantità maggiore o minore nella cellula neoplastica rispetto al normale contenuto diploide. Il livello di informazione ottenuto da questa metodica detta **citoflussimetria** è ancora più grossolano: è necessaria infatti una quantità di DNA in più od in meno pari a quella contenuta in 2 cromosomi (= 30.000 geni!) affinché venga evidenziata una variazione nel contenuto genomico di una popolazione cellulare. Come vedremo però, questa informazione può rivestire un certo significato prognostico nei TCC vescicali.

Il **cap. 13** definirà le tecniche della citoflussimetria ed i parametri da prendersi in considerazione nell'analisi dei TCC.

Il **cap. 14** tratterà invece del significato prognostico della citoflussimetria nei TCC.

CAP. 3: I GENI DEL CANCRO: ONCOGENI E GENI SOPPRESSORI DI TUMORE

GLI ONCOGENI: PROTO-ONCOGENI “ATTIVATI”

I **proto-oncogeni** sono dei normali geni cellulari che codificano per proteine nucleari e citoplasmatiche in grado di regolare il normale programma di proliferazione e differenziazione cellulare. Tali proteine sono organizzate per funzionare con un meccanismo “a cascata” che partendo dallo spazio extracellulare arriva fino al nucleo, a livello del DNA (**figura 6**). Sono stati evidenziati sinora prodotti di proto-oncogeni associati ad ognuno dei vari stadi che scandiscono la trasduzione del segnale proliferativo dall'esterno della cellula (mediato da una proteina detta “fattore di crescita”) sino all'attivazione del DNA (tramite una proteina nucleare che funziona da “attivatore della trascrizione”).

Qualsiasi di questi proto-oncogeni (che, lo ricordiamo, sono normali geni cellulari) può andare incontro ad una mutazione e diventare così un vero e proprio **oncogene** (= gene provocatore di cancro). La condizione essenziale è però che la mutazione si traduca in una “iperattivazione” di un gene normalmente espresso oppure comporti la “attivazione” di un gene a funzione oncogenica che nella cellula normale non è espresso. Meccanismi come l'amplificazione genica, l'inserimento di sequenze di promotori trascrizionali contigualmente a geni inespresi oppure mutazioni puntiformi risultanti in una iperfunzione dei prodotti proteici possono spiegare questo fenomeno.

Classicamente gli oncogeni agiscono in modo “dominante”, nel senso che è sufficiente l'alterazione di uno solo dei 2 alleli per provocarne l'attivazione.

I GENI SOPPRESSORI DI TUMORE: GENI INATTIVATI NEL CANCRO

Un altro dei meccanismi genetici che si è visto essere operativo durante lo sviluppo tumorale è la soppressione (= delezione) o l'inattivazione (= mutazione risultante in una perdita di funzione del prodotto proteico) di un'altra categoria di geni il cui compito fisiologico è quello di agire in senso inibitorio nei confronti della proliferazione e quindi

di proteggere il genoma dal cancro. Tali geni, opportunamente definiti anti-oncogeni o **geni soppressori di tumore (G.S.T.)** funzionano pertanto esattamente all'opposto dei proto-oncogeni (che sono invece degli acceleratori della proliferazione). Generalmente i G.S.T., al contrario dei proto-oncogeni, si comportano in modo recessivo, nel senso che la perdita della funzione richiede l'inattivazione di entrambi gli alleli, poiché l'integrità anche di un solo allele è in grado di garantirne la normale funzione.

COME SONO STATI SCOPERTI I GENI DEL CANCRO

La scoperta degli oncogeni

A tutt'oggi sono noti circa un centinaio di oncogeni e poco più di 10 G.S.T. Se si pensa all'enorme lunghezza e complessità del genoma umano ci si chiede come si sia giunti ad identificare e sequenziare singoli geni distribuiti a caso nell'enorme matassa. Ciò che ha semplificato enormemente la ricerca è stato lo studio di alcuni particolari virus esistenti in natura, i quali, quando infettano alcuni organismi (per lo più certe specie di volatili o mammiferi, rarissimamente l'uomo) sono in grado di indurre la trasformazione cellulare. Si tratta di infezioni abortive, in cui il virus in questione, dopo aver integrato il suo piccolo patrimonio genetico (DNA od RNA) nel genoma della cellula ospite, non è in grado di proseguire attraverso un normale ciclo litico che dovrebbe culminare di solito con il rilascio di numerose particelle virali e con la distruzione della cellula. Cosa è successo? Andando a sequenziare il piccolo genoma di tali virus si è visto che per esempio alcuni virus ad RNA (detti retrovirus), anziché possedere i geni in grado di codificare le proprie strutture virali, contenevano sequenze genomiche sconosciute che, una volta introdotte in una cellula, erano in grado di trasformarla in senso neoplastico. Ancora più interessante è stato il constatare che questi geni (denominati poi oncogeni virali, o **v-onc**) avevano un omologo nella cellula umana che fu definito proto-oncogene e per distinguerlo dall'omologo virale siglato come **c-onc**. In questo modo almeno 25 c-onc sono stati sinora identificati grazie alla loro presenza nei retrovirus. Come fa l'oncogene virale a "trasformare" la cellula? La teoria più probabile è che il v-onc sia funzionalmente indistinguibile da c-onc (e quindi come tale non in grado di trasformare), ma diventi "oncogeno" perché diviene iperespresso ad opera di promotori

virali durante l'infezione cellulare. L'altra possibilita' e' che v-onc sia in realta' un c-onc "attivato" ad opera di una mutazione. Cosa facilmente ipotizzabile se si pensa che i v-onc non esistono da sempre nei retrovirus portatori, ma sono in realta' dei c-onc "rubati" un tempo ad una cellula probabilmente per un errore commesso durante il ciclo infettivo.

I virus a DNA invece non veicolano dei v-onc omologhi ai c-onc. Il loro potere trasformante deriva dal fatto che alcune proteine del normale corredo virale sono in grado di legarsi alle proteine prodotte da G.S.T. normofunzionanti, con il risultato di inattivarli.

I tumori ereditari: l'ipotesi dei geni soppressori di tumore (G.S.T.)

La constatazione che specifiche regioni cromosomiche sono costantemente delete in alcuni tumori, ha portato ad ipotizzare che alcuni geni responsabili del cancro funzionino non tanto come gli oncogeni dove attivazione = aumento di funzione = cancro, ma piuttosto come geni deputati normalmente a sopprimere l'insorgenza dei tumori, in cui una delezione = perdita della funzione genica protettiva = cancro.

Un grosso aiuto alla comprensione della natura dei G.S.T. e' derivata dall'analisi genetica molecolare delle poche e rare sindromi tumorali ereditarie, in particolare il retinoblastoma. Quest'ultimo e' un cancro della retina che nella maggior parte dei casi si manifesta in modo sporadico negli adulti e colpisce solo un occhio, mentre in una piccola percentuale di casi da' origine a tumori ad andamento familiare, a trasmissione autosomica dominante, che colpiscono i bambini ad entranbi gli occhi oltre che uno svariato numero di altre sedi. Partendo da questa osservazione Kudson nel 1971 ha proposto una semplice ipotesi genetica che potesse spiegare il fenomeno: sia nella forma sporadica che in quella familiare vi sono mutazioni a carico di entrambi gli alleli di un gene "x" che sara' responsabile del retinoblastoma. Nella forma familiare pero' l'individuo nasce con un allele mutato che ha ereditato dai genitori (e quindi la mutazione sara' presente in tutte le cellule del corpo). Una seconda mutazione (questa volta somatica) puo' verificarsi nei retinoblasti del bambino (che sono molto recettivi) a carico del rimanente allele dando cosi' origine al retinoblastoma, oppure puo' avvenire casualmente in qualsiasi altro tipo cellulare e dare cosi' origine a svariati tumori (che compaiono di solito in un'eta' piu' adulta). Nella forma sporadica invece entrambe le mutazioni sono somatiche, cioe' acquisite casualmente dopo la nascita. Di solito la prima

delle 2 si verifica a carico di un allele del retinoblastoma del bambino. Se poi lo stesso individuo nel corso della vita acquisisce un'ulteriore mutazione a carico dell'allele controlaterale allora sviluppa il cosiddetto retinoblastoma dell'adulto, che avrà un andamento non familiare. L'ipotesi di Knudson venne ben presto confermata da studi molecolari: nelle forme familiari il gene "x", cui venne dato il nome di gene del retinoblastoma (Rb), era costantemente deletato e la comparsa di malattia si accompagnava ad una mutazione del gene controlaterale. Il Rb doveva pertanto svolgere fisiologicamente una funzione protettiva nei confronti del cancro e fu il primo ad essere classificato nella serie dei cosiddetti G.S.T. (**figura 7**).

Allo stesso modo si comporta il G.S.T. p53, del quale è nota una rarissima forma familiare, la Sindrome di Li Fraumeni, in cui gli individui colpiti sono tutti portatori di una mutazione allelica del gene p53 che viene trasmessa con le cellule germinali, e di solito sviluppano svariati tipi di tumori a partire dai 30 anni in poi, età in cui verosimilmente cominciano a verificarsi mutazioni sporadiche a carico dell'allele controlaterale, con conseguente inattivazione totale della funzione genica.

La funzione dei geni Rb e p53 verrà trattata in appositi capitoli, poiché la loro inattivazione è di comune riscontro nei TCC.

BIBLIOGRAFIA

Alison M.R. and Sarraf C.E. Understanding cancer. Cambridge University Press. 1997.

Bishop P. Cellular and viral oncogenes. Ann Rev Biochem 1983; 52: 301-354.

Friend SH, Dryja TP and Weinberg RA. Oncogenes and tumour suppressor genes. Science 1988; 318: 618-622.

Lewin B. Genes VI. Oxford University Press. VI Ed., 1996.

CAP. 4: TECNICHE DI DETERMINAZIONE DEI MARCATORI GENICI

INTRODUZIONE

La comprensione dei numerosi studi condotti sugli oncogeni e sui G.S.T. coinvolti nel processo neoplastico delle cellule transizionali non puo' prescindere da alcune nozioni sulle tecniche di biologia molecolare o di immunoistochimica, oggi divenute appannaggio non piu' solo di laboratori d'avanguardia, ma anche della routine clinica ospedaliera.

Come illustrato nella **tabella 4**, un marcatore puo' essere evidenziato a livello del DNA, oppure del suo RNA od infine come prodotto proteico della trascrizione dell'RNA. Ad ognuno di questi 3 livelli corrisponderanno specifiche metodiche di determinazione.

TECNICHE DI STUDIO DEL DNA TUMORALE

Permettono di verificare se un determinato oncogene e' attivato (per mutazione od amplificazione), oppure se un G.S.T. e' inattivato (per mutazione o per delezione). Pur essendo diverso l'approccio a seconda che si voglia individuare una mutazione gia' nota per altri tumori piuttosto che cercare se un gene "x" e' portatore di una variazione che non e' ancora mai descritta (cioe' una nuova mutazione), possiamo dire che oggi giorno gran parte della biologia molecolare gravita essenzialmente attorno a 2 metodiche: il Southern Blotting e la Polymerase Chain Reaction (PCR).

Southern Blotting

Definizione

E' una metodica che consente, dopo aver tagliato il DNA in numerosi pezzi, di andare ad identificare una particolare sequenza di basi (un gene od una sua parte) mediante una sonda di DNA ad essa complementare che andra' ad ibridizzarsi ad essa (cioe' a formare un tratto a doppia elica).

Note di tecnica

Consta di diverse fasi schematizzate nella **figura 8**.

1. Estrazione del DNA dalla cellula.

2. Frammentazione del DNA per mezzo di enzimi di restrizione.

Questi sono dei particolari enzimi, isolati da batteri, che hanno la proprietà di clivare il DNA in modo altamente specifico. I batteri li utilizzano per difendersi dall'aggressione dei virus. Il loro meccanismo d'azione consiste nello scorrere su un doppio filamento di DNA fino a quando incontrano una particolare sequenza di basi che costituisce il sito di riconoscimento su cui operare il taglio. Ne sono noti circa 180, ciascuno con un sito diverso e di varia lunghezza. Di solito vengono utilizzati enzimi con siti a 6 paia di basi in modo da formare frammenti genomici abbastanza lunghi, così che il gene da ricercarsi sia interamente contenuto nel pezzo.

3. Elettroforesi su gel dei frammenti.

I frammenti di DNA sono tutti carichi negativamente. Pertanto, una volta posti in un campo elettrico, migreranno tutti nella stessa direzione separandosi in base al peso molecolare (quelli a basso peso molecolare migreranno più velocemente).

4. Denaturazione del DNA e suo trasferimento su di un filtro.

Scaldando il DNA messo in soluzione, i ponti di idrogeno che legano tra di loro le due eliche si dissolvono rapidamente con la formazione di 2 monofilamenti di DNA separati. Non appena però la soluzione si raffredda, le due eliche di DNA si riavvolgono nuovamente. Se però il DNA viene posto su uno strato di nitrocellulosa o di nylon, i vari monofilamenti vengono intrappolati senza possibilità di riunirsi. I frammenti di DNA vengono di solito trasferiti su di un filtro che ne lascia pressoché inalterata la distribuzione spaziale ottenuta durante la migrazione nel gel di agarosio.

5. Ibridizzazione

Se un certo numero di filamenti di DNA esogeno marcato radioattivamente e con sequenza corrispondente ad un gene che vogliamo studiare viene cosparso sul filtro teste' descritto ed il tutto viene poi lentamente raffreddato, uno di questi andrà a legarsi al frammento ad esso complementare nel filtro, esattamente nel punto in cui il frammento stesso è migrato. Il filtro viene poi lavato con diversi tamponi al fine di rimuovere le sonde di DNA radioattive in eccesso.

6. Visualizzazione mediante autoradiografia

Il passo finale consiste nell'identificare il punto in cui e' avvenuta l'ibridizzazione. Dal momento che la sonda di DNA e' marcata radioattivamente, il frammento ibridato apparira' all'autoradiografia come una banda nera su un fondo bianco.

Questa metodica ha posto le basi della biologia molecolare degli ultimi 10 anni. Se per esempio un oncogene che andiamo cercando e' deletato, al termine della nostra procedura noi non troveremo alcuna banda scura nella lastra. Se invece il gene fosse amplificato noi dovremmo in teoria aspettarci una banda scura molto intensa. Utilizzando poi alcuni accorgimenti tecnici (vedi oltre) e' possibile, mediante il Southern Blotting, arrivare ad identificare anche la presenza di una singola mutazione puntiforme in un gene!

Applicazioni del Southern Blotting

*A) Individuare delezioni di alleli utilizzando lo stratagemma dei **RFLP** (Restriction fragment length polymorphisms)*

Abbiamo detto che uno dei meccanismi carcinogenetici che coinvolge i G.S.T. e' rappresentato dalla delezione di un allele associata alla mutazione del controlaterale. Il Southern Blotting e' in linea di principio un ottimo metodo per dimostrare delle delezioni. Il fatto e' che se la delezione interessa un solo allele, alla fine del nostro procedimento noi troveremo comunque l'esistenza di una "banda scura" dovuta alla presenza dell'altro allele. Questo inconveniente e' stato risolto con l'osservazione che spesso nei genomi umani normali esiste un elevato polimorfismo dei cosiddetti "frammenti di restrizione", che altro non sono che i pezzi di DNA sui quali gli enzimi di restrizione operano il taglio. Questo fatto genera pertanto un polimorfismo nei due alleli i quali, sottoposti all'azione di clivaggio dell'enzima di restrizione "x", verranno a trovarsi in 2 frammenti di DNA di diversa lunghezza (poiche' nella zona contigua ad uno dei due alleli l'enzima non ha riconosciuto il sito di restrizione mascherato da una mutazione) che pertanto migreranno in 2 zone diverse, creando cosi' una situazione di "eterozigosi" dei frammenti. All'autoradiografia queste due zone appariranno come due bande scure una volta avvenuta l'ibridizzazione. Al contrario, l'autoradiografia di un soggetto portatore di

una delezione a carico di uno dei due alleli, rivelerà la presenza di una sola banda scura. Questa situazione viene definita **perdita dell'eterozigosi** (universalmente indicata in letteratura con l'abbreviazione di **LOH**, dal termine anglosassone "loss of heterozygosity") ed è di comune riscontro nello studio del G.S.T. p53 dove spesso uno dei due alleli è deleto (**figura 9**).

B) Individuare mutazioni note a carico di un oncogene utilizzando gli oligonucleotidi

La presenza di una mutazione oncogenica che sappiamo verificarsi in un punto preciso del gene, può essere facilmente individuata mediante il Southern Blotting. Basta far "ibridare" un dato oncogene non con una sonda lunga quanto tutto il gene (che di solito è di alcune migliaia di basi) come si fa per vedere se c'è una delezione, bensì con un oligonucleotide (cioè un pezzettino di DNA non più lungo di 25 basi) che comprenda però la zona della mutazione. Se per esempio noi sappiamo che un determinato oncogene presenta costantemente una mutazione puntiforme alla base numero 45 della sua sequenza, utilizzeremo un oligonucleotide che sia complementare alle basi che vanno dalla posizione 35 alla 55. Un oligonucleotide è in grado di riconoscere un'alterazione di una singola base nella sequenza contro cui va ad "ibridarsi". Infatti, in presenza anche di una singola sostituzione di base, l'ibridizzazione non si verificherà a motivo della notevole instabilità del legame, con conseguente assenza della banda scura all'autoradiografia (Brock D.J.H., 1993).

La Polymerase Chain Reaction (PCR)

Identificare un gene oncogeno che nell'intero genoma si trova normalmente solo in doppia copia (due alleli) mediante la tecnica del Southern Blotting non è così ovvio come lo abbiamo finora presentato. Posto che il gene in questione non sia stato frammentato lui stesso da un enzima di restrizione (cosa del tutto possibile), la banda di ibridizzazione è comunque così piccola da richiedere spesso una settimana di esposizione della pellicola autoradiografica per rendersi visibile.

A questo inconveniente ha posto rimedio la scoperta nel 1985 di una procedura che permette l'amplificazione selettiva di specifiche regioni del genoma di un fattore di 10^6 .

In altre parole e' possibile ottenere in vitro milioni di copie di un determinato oncogene in poche ore. Il vantaggio immediato che ne deriva e' una piu' facile identificazione del gene sulla pellicola autoradiografica, poiche' tutte le copie migreranno nella stessa zona e si ibridizzeranno con altrettante sonde radioattive con la formazione di un segnale molto intenso.

Questa tecnica presuppone che almeno il tratto iniziale del DNA da ibridizzare sia noto, in modo da permettere la costruzione di un oligonucleotide ad esso complementare, detto "primer" perche' funge da punto d'inizio per la sintesi. Una volta che il primer si e' legato al frammento che vogliamo amplificare viene aggiunta in vitro una certa quantita' di DNA polimerasi, un enzima che ha la proprieta' di aggiungere basi nucleotidiche allungando cosi' il primer e formando una prima copia del frammento.

La **figura 10** illustra come utilizzando due "primers", ciascuno complementare ad una delle due eliche del frammento da amplificare, alla fine di un primo ciclo di sintesi si ottengano due frammenti a doppia elica. La denaturazione di questi fa si' che per il secondo ciclo i frammenti utilizzabili come substrato dalla DNA polimerasi siano 4, mentre per il terzo ciclo saranno 8, cosi' che il processo di amplificazione puo' svolgersi in modo esponenziale (Immis M.A., 1990; Elrich H.A., 1989).

Analisi mutazionale

Nei casi in cui una ricerca sia mirata ad identificare una mutazione oncogenica sconosciuta (poiche' il suddetto gene non e' ancora stato studiato nel tessuto che interessa o perche' si tratta di un locus genico che presenta un'estrema variabilita' di mutazioni), e' spesso necessario applicare le sofisticate metodiche dell'analisi mutazionale.

Le principali sono rappresentate da:

A) Clivaggio chimico delle basi disaccoppiate

Si basa sul principio che se si fa ibridare una sonda di DNA complementare ad un oncogene portatore di una mutazione puntiforme, il punto di mutazione avra' due basi complementari spaiate. Se si costruisce una sonda di DNA utilizzando due tipi di basi (di solito l'uracile e la citosina) appositamente modificati mediante l'aggiunta di una

determinata molecola alla loro struttura chimica di base, e la si fa ibridare con l'oncogene in questione, una particolare sostanza, la piperdina, aggiunta alla soluzione, andr  a clivare il frammento ibridato nei punti in cui i nucleotidi modificati non si sono appaiati, che altro non   se non il punto di mutazione.

Si otterranno cos  due (se la mutazione   singola) o pi  frammenti genici che potranno cos  essere amplificati con la PCR ed isolati con il Southern Blotting. Ovviamente questa tecnica consente solo di determinare la lunghezza dei frammenti, dando quindi una informazione sul punto approssimativo di mutazione.

B) Tecniche di sequenziamento del DNA

Consentono di determinare esattamente la sequenza dell'oncogene mutato. Anche queste tecniche prevedono innanzitutto l'amplificazione dell'oncogene in oggetto mediante PCR. Su di un singolo filamento del DNA genico si fa poi integrare un primer complementare che rappresenta il sito di inizio di una DNA polimerasi. La stessa reazione viene fatta avvenire in 4 distinte provette, aggiungendo a ciascuna una miscela di nucleotidi, di cui almeno uno marcato radioattivamente (per renderlo identificabile al Southern Blotting). Il punto chiave della metodica consiste nel bloccare di tanto in tanto il processo di duplicazione dei frammenti aggiungendo in ciascuna provetta uno specifico nucleotide modificato in modo da bloccare la reazione (ad esempio nella provetta 1 si aggiunger  l'adenina modificata, nella 2 la citosina, nella 3 la guanina e nella 4 la timidina). Ad un certo punto della reazione si avranno in ciascuna provetta una miscela di frammenti di DNA genico di varia lunghezza ed interrotti dallo stesso nucleotide di coda. Facendo scorrere su gel i frammenti di ciascuna provetta si otterr  una distribuzione ordinata nello spazio in modo da poter risalire alla sequenza precisa del gene (Davies K.E., 1988).

SSCP (Single-stranded conformational polymorphism)

L'analisi mutazionale appena descritta   una metodica ottima ed oltremodo precisa nel determinare esattamente la sede ed il tipo di mutazione su un gene, ma diventa alquanto indaginosa soprattutto quando si tratta di sequenziare un gene molto lungo.

Spesso poi lo scopo che ci si prefigge e' quello di sapere solo se un determinato gene sia o meno andato incontro a mutazione, senza pretesa di conoscerne esattamente la natura.

La tecnica che utilizza il polimorfismo dei frammenti genici a singolo filamento (SSCP) e' un ottimo metodo di "screening" delle mutazioni a carico di un determinato gene. Si basa sul fatto che i prodotti di DNA a doppio filamento, marcati radioattivamente, ed amplificati per mezzo della PCR, se resi a singolo filamento, si ripiegano su loro stessi a formare una struttura tridimensionale. Una alterazione nella sequenza di DNA puo' risultare in una differente conformazione la quale, sotto appropriate condizioni del gel, risulta in una differente mobilita' elettroforetica, chiamata appunto polimorfismo conformazionale (Mueller R.F. and Young I.D., 1995).

Conclusioni

Numerosi studi sui TCC si sono avvalsi delle tecniche di studio del DNA oncogenico ora esposte consentendo cosi' di:

1. evidenziare mutazioni gia' note a carico di determinati oncogeni (PCR + Southern blotting utilizzando oligonucleotidi per la ibridizzazione)
2. determinare il tipo e la sede di mutazioni che erano sconosciute (PCR + Southern blotting + tecniche di analisi mutazionale)
3. stabilire la sede e la frequenza di delezioni a carico di un allele portatore di un gene soppressore di tumore (PCR + Southern Blotting condotto sui RFLP al fine di dimostrare le perdita dell'eterozigosi).

TECNICHE DI STUDIO DELL'RNA NEI TUMORI

Introduzione

Come abbiamo illustrato nella prima parte della trattazione, i geni dotati di una funzione metabolica vengono trascritti in RNA e conseguentemente tradotti in proteine. Quando

l'attivazione di un determinato oncogene si traduce in un' iperespressione del suo prodotto proteico nella cellula, sia per un processo di amplificazione genica o perche' una mutazione a carico dei promotori ne aumenta la trascrizione, dovremmo aspettarci di trovare una quantita' maggiore di mRNA per quel determinato gene. La quantificazione di tale RNA sara' pertanto una prova indiretta di cio' che e' avvenuto a livello del DNA per quel gene.

Northern Blotting

E' una procedura che consente di quantificare l'RNA cellulare. Altro non e' che una tecnica di ibridizzazione condotta sull'RNA una volta che sia estratto dalla cellula. Ricalca a grandi linee i passaggi del Southern Blotting ma con alcune semplificazioni.

Per esempio la frammentazione dell'RNA non e' necessaria, poiche di solito l'ordine di grandezza naturale di questo acido nucleico e' gia' adeguato all'elettroforesi. Una volta che l'RNA cellulare, appositamente denaturato al fine di distruggerne la struttura secondaria, ha terminato la sua corsa sul gel per elettroforesi, viene attuata l'ibridizzazione con una sonda di DNA complementare all'RNA oncogenico che interessa individuare. Una stima approssimativa della quantita' di RNA nel campione puo' essere desunta semplicemente dall'intensita' del segnale autoradiografico prodotto dalla banda di ibridizzazione (Brock D.J.H., 1993).

TECNICHE DI STUDIO DELLE PROTEINE

La metodica immunoistochimica

Definizione ed utilizzo

L'immunoistochimica e' l'utilizzo di anticorpi "marcati" con specifici reagenti per la localizzazione di componenti dei tessuti che fungono da antigeni (genericamente si tratta di proteine).

La presenza o l'assenza di un determinato oncogene o G.S.T. potrà essere facilmente dedotta con questa tecnica che permette di visualizzarne la relativa espressione proteica per mezzo di autoradiografia (se l'anticorpo è marcato radioattivamente), con microscopio a fluorescenza (se l'anticorpo è coniugato con fluorescina) oppure più semplicemente con un microscopio ottico (se l'anticorpo è coniugato con enzimi che fanno avvenire una reazione chimica in grado di "colorare" la cellula che contiene l'antigene).

Anticorpi

Gli anticorpi, che sono generalmente delle γ -globuline, vengono ottenuti attraverso l'immunizzazione di conigli o topi con gli antigeni che interessano. Per quanto puro possa però essere l'antigene impiegato, l'antisiero sarà costituito comunque da anticorpi diretti verso diverse parti della molecola antigenica oppure conterrà molti anticorpi naturali (cioè propri dell'animale) che potranno reagire con componenti tissutali. In pratica sarà un siero policlonale.

Recentemente è stato tuttavia sperimentato un metodo per la produzione di **anticorpi monoclonali**, cioè dotati di un'assoluta specificità per un singolo epitopo sulla molecola antigenica. Questi anticorpi "puri" vengono ottenuti attraverso la fusione di linfociti di topo specifici per l'antigene in questione (un linfocita produce infatti un solo tipo di anticorpo) con cellule di mieloma di topo. La cellula ibrida sarà così in grado di produrre indefinitamente un solo tipo di anticorpo (McMichael A.J., 1982).

Antigeni

Perché l'immunoreazione avvenga occorre che l'antigene non sia alterato nella sua struttura terziaria. Molti fissativi tissutali come la formaldeide alterano questa struttura attraverso la formazione di legami tra l'aldeide e le molecole proteiche, con il risultato di "mascherare" i siti antigenici. Per questo motivo fino ad alcuni anni fa le reazioni immunoistochimiche venivano condotte solo su sezioni al criostato di tessuti congelati.

L'avvento di vari espedienti che permettono il "recupero" degli antigeni mascherati attraverso la rottura del legame aldeidico sulle proteine (come per esempio la digestione per mezzo di proteasi oppure il riscaldamento dei preparati in forno a microonde) (Norton

A.J. et al., 1994) ha permesso l'applicazione routinaria delle tecniche immunoistochimiche su preparati inclusi in paraffina, rendendo così possibili studi retrospettivi.

Note di tecnica: i metodi immunoenzimatici

I metodi immunoenzimatici hanno oggi largamente sostituito le metodiche di immunofluorescenza, le quali, oltre a richiedere uno speciale microscopio, producono reazioni destinate a decadere nel tempo.

1. Il metodo della perossidasi coniugata all'anticorpo

È un metodo indiretto, cioè l'anticorpo primario (specifico per l'antigene) non è coniugato, mentre l'enzima perossidasi viene legato ad un secondo anticorpo (specifico per l'anticorpo primario), il quale va a formare un secondo strato. Quindi l'anticorpo primario si lega ai siti antigenici ed a sua volta agisce da antigene per il secondo anticorpo. L'avvenuto legame viene visualizzato aggiungendo un substrato (es. la diaminobenzidina) che la reazione perossidasi converte in sostanza colorata (Nakane P.K. et al., 1966).

2. Il metodo perossidasi anti-perossidasi

Rappresenta un'evoluzione del precedente. Questa tecnica prevede un terzo strato (da qui il termine di "triplo sandwich"), costituito da un anticorpo anti-perossidasi (γ -globulina di coniglio) coniugato con perossidasi per formare un complesso perossidasi anti-perossidasi molto stabile. Il complesso si lega all'anticorpo anti-immunoglobulina di coniglio del secondo strato che invece non è coniugato (**figura 11**).

Il vantaggio principale si traduce in un aumento della sensibilità di 100-1000 volte poiché il legame è più stabile ed una maggior quantità di perossidasi viene a legarsi al sito antigenico (Sternberg L.A., 1986).

3. Il metodo avidina-biotina

È la metodica immunoistochimica attualmente più utilizzata. Il complesso avidina biotina (ABC) è una valida alternativa al complesso perossidasi anti-perossidasi che è alquanto complicato da realizzare. L'avidina è una glicoproteina presente nell'albume che possiede 4 siti di legame ad elevata affinità per la biotina, una piccola molecola riscontrata nel tuorlo dell'uovo. La biotina può essere coniugata ad anticorpi in gran

quantita' come pure alla perossidasi. La reazione consta pertanto di 3 strati: il primo e' rappresentato da un anticorpo di coniglio specifico per l'antigene; il secondo e' costituito da un anticorpo biotinilato anti-IgG di coniglio; infine il terzo strato e' composto dal complesso avidina + perossidasi biotinilata che si lega al secondo strato grazie all'affinita' della biotina per l'avidina. La perossidasi viene poi fatta agire sulla diaminobenzidina producendo la reazione colorimetrica (Coggi G. et al., 1986).

BIBLIOGRAFIA

Brock D.J.H. Molecular genetics for the clinician. Cambridge University Press.1993.

Coggi G., Dell'Orto P. and Viale G. Avidin-biotin methods. In immunocytochemistry, modern methods and applications, (2nd edn), (ed. J.M. Polak and S. Van Noorden), pp 54-70. John Wright & Sons, Bristol. 1986.

Davies K.E. (Editor). Genome analysis: a practical approach. IRL Press, Oxford, 1988.

Elrich H.A., Gibbs R. and Kararian H.H. (Editors). Polimerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

Immis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. and Wright T.J. (Editors). PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, CA, 1990.

McMichael A.J. and Fabre J.W. Monoclonal antibodies in clinical medicine. Academic Press, London. 1982.

Mueller R.F. and Young I.D. Emery's elements of medical genetics. Ninth Edition. Churchill Livingstone, New York, 1995.

Nakane P.K. and Pierce G.B. Jr. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. J. Histochem Cytochem 1966; 14: 929-931.

Norton A.J., Jordan S. and Yeomans P. Brief, high temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J Pathol* 1994; 173: 371-379.

Sternberg L.A. *Immunocytochemistry* 3th ed, John Wiley and Sons, New York, 1986.

CAP. 5: LA LOCALIZZAZIONE DEGLI ONCOGENI E DEI GENI SOPPRESSORI DI TUMORE NELLA CELLULA RIFLETTE LA LORO FUNZIONE

LA “CASCATA” ONCOGENICA

Una volta “attivati” in seguito a mutazioni, gli oncogeni intervengono in qualche modo ad influenzare, direttamente od indirettamente, le funzioni connesse con il ciclo cellulare. I cambiamenti fenotipici della cellula neoplastica sono messi in atto a livello cellulare dalle proteine alterate che vengono da essi prodotte.

La comprensione di questo complesso di funzioni non puo' prescindere dalla conoscenza della funzione fisiologica espletata dalle proteine “normali”, cioe' codificate da quelli che abbiamo definito come proto-oncogeni.

Cio' che induce una cellula “sana” a modulare il suo ciclo proliferativo (attivandolo o disattivandolo a seconda delle esigenze), e' una specie di comando proveniente dall'ambiente extracellulare, inviato di solito da altre cellule. L'effettore di questo tipo di comunicazione intercellulare e' una proteina, detta **fattore di crescita**, la quale va a legarsi ad uno specifico sito di riconoscimento sulla cellula bersaglio, chiamato **recettore per il fattore di crescita**. Il legame fattore di crescita-recettore provoca una modificazione nella conformazione della porzione intramembrana del recettore che porta alla attivazione di una serie di proteine adese alla parete interna della membrana cellulare (**proteine associate alla membrana cellulare**), distinte a loro volta in diverse classi, tra cui spiccano le proteine ad attivita' tirosina-cinasica (l'attivita' cinasica altro non e' che la capacita' di fosforilare determinate proteine a livello di specifici aminoacidi). La reciproca interazione di queste ultime porta all'attivazione di ulteriori proteine che si trovano sparse nel citoplasma e che sono di solito caratterizzate da un'attivita' enzimatica di tipo serina-treonina cinasica (**proteine serina-treonina cinasi citoplasmatiche**).

Pertanto il segnale proliferativo viene trasportato per mezzo della reciproca attivazione di proteine aventi attivita' enzimatica, producendo l'effetto di una cascata intracellulare a partire dal recettore di membrana che esercita un'attivita' tirosina-cinasica sulle proteine membrana-associate, le quali a loro volta sono dotate di attivita' tirosina-cinasica sulle

proteine citoplasmatiche. A livello di queste ultime avviene una specie di “switch” nella funzione cinasica, nel senso che la proprietà di fosforilare substrati in tirosina cede il posto a quella di fosforilare in serina-treonina. Tale passaggio sembra essere mediato dall’oncogene RAS (che verrà trattato in dettaglio nel capitolo 8).

La tappa conclusiva di questa cascata di eventi è rappresentata dall’attivazione di **proteine nucleari** (un passaggio mediato anch’esso da reazioni di fosforilazione). Alcune di queste ultime fungono da attivatori diretti della trascrizione genica, trovandosi a stretto contatto con il DNA, una posizione eccellente per promuovere cambiamenti nell’espressione genica.

A tutti i gruppi di proteine testate citate è stata riconosciuta la dignità di proto-oncogeni, poiché si è visto che una loro mutazione (attivazione oncogenica) si associa, in misura variabile, alla stragrande maggioranza dei tumori. Nel nucleo cellulare esistono poi altre proteine con la funzione di modulare in senso inibitorio i processi di proliferazione e di attivazione trascrizionale. A motivo dell’evidente azione protettiva nei confronti del cancro queste ultime sono state designate con il termine di “geni soppressore di tumore”.

Nella **figura 12** vengono riportate, per ciascuna locazione cellulare, alcune delle proteine che più frequentemente risultano alterate nei tumori umani e che costituiranno pertanto oggetto di discussione nei capitoli successivi dedicati ai TCC.

BIBLIOGRAFIA

Lewin B. Genes VI. Oxford University Press. 1996.

CAP. 6: ONCOGENI CHE CODIFICANO PER FATTORI DI CRESCITA

INTRODUZIONE

Una cellula normale, per poter crescere e replicarsi, necessita di un mezzo culturale (ad esempio il siero) ricco di sostanze chiamate **fattori di crescita**. La cellula trasformata in senso neoplastico e' invece in grado di replicarsi indefinitamente anche in terreni che contengano solo sostanze nutrienti molto semplici. Cosa conferisce loro l'indipendenza dal siero? E' verosimile che le cellule maligne siano in grado di produrre in modo autogeno dei fattori di crescita (per i quali possiedono specifici recettori) con un meccanismo definito secrezione autocrina. Quest'ultimo e' in grado di conferire un vantaggio proliferativo alle cellule tumorali che si trovano cosi' ad essere svincolate dal controllo proliferativo da parte dell'ambiente extracellulare.

I FATTORI DI CRESCITA

La secrezione autocrina fu descritta per la prima volta in cellule di roditore trasformate da un virus sarcomatoso, dove la miscela di peptidi secreta dalla cellula (originariamente chiamata "fattore di crescita per il sarcoma") conteneva una molecola correlabile ma nello stesso tempo distinta dall'**EGF** (fattore di crescita dell'epidermide) e percio' siglata come **TGF α** (transforming growth factor alfa). Ben presto furono riconosciuti altri peptidi con analoga funzione, quali il PDGF (Platelet derived growth factor) prodotto da cellule di osteosarcomi e gliomi, e la bombesina, un tetrapeptide secreto da carcinomi polmonari a piccole cellule.

La cascata di segnali attivati da un fattore di crescita autocrino puo' anche evocare uno stimolo negativo alla crescita cellulare, cioe' agire come un "piede sul freno" piuttosto che come un "piede sull'acceleratore". Il migliore esempio di fattore di crescita negativo e' il **TGF β** , isolato insieme al TGF α dalla miscela di polipeptidi responsabili del sarcoma di roditore indotto da virus. Il termine transforming growth factor β e' pertanto improprio in quanto le sue attivita' biologiche si estendono ben oltre il contesto della sua scoperta

iniziale (Alison M., 1997). E' possibile pero' che i tumori in stadio avanzato perdano la capacita' di rispondere al TGF β , con un risultante effetto di promozione sulla crescita cellulare (Wakefield et al., 1992). In vivo il TGF β sembra poi possedere una spiccata attivita' angiogenetica (Yang et al., 1990). L'angiogenesi e' oggi considerata un evento iniziale nella tumorigenesi e sembra condizionare una maggiore aggressivita' neoplastica (Liotta et al., 1991). Emerge pertanto un ruolo alquanto complesso del TGF β nella trasformazione cellulare. Finora sono stati descritti 5 tipi di molecole TGF β , siglate con i numeri da 1 a 5, ma nei mammiferi sono state riscontrate solo le isoforme 1, 2 e 3 (Roberts A.B. et al., 1990). Le principali caratteristiche biochimiche dei fattori di crescita sono riassunte nella **tabella 5**.

Vi e' ormai una convinzione crescente che l'anomala produzione autocrina di un determinato fattore di crescita sia il risultato di una o piu' attivazioni oncogeniche. Perche' un fattore di crescita possa agire, occorre che si leghi ad uno specifico recettore di membrana (i fattori di crescita sono infatti proteine idrofile e pertanto impermeabili alla membrana cellulare). I vari complessi ligando-recettore, una volta esplicito il compito di trasdurre il segnale dallo spazio extracellulare all'interno della cellula, vengono internalizzati per mezzo di un processo di endocitosi con successivo ricircolo dei recettori i quali vengono riesposti per la maggior parte sulla membrana, mentre una parte di essi viene degradata nei lisosomi (cosiddetta "down regulation" dei recettori). In tal modo puo' spiegarsi la positivita' immunoistochimica per i recettori rinvenuta sovente non solo sulla membrana ma bensì anche a livello citoplasmatico (**figura 13**).

VALORE PROGNOSTICO DEI FATTORI DI CRESCITA NEI TCC VESCICALI

Il fattore di crescita da piu' tempo studiato e quindi meglio caratterizzato nei TCC e' l'EGF, anche se lavori recenti si sono occupati del ruolo di TGF α e β nella tumorigenesi degli uroteliomi.

EGF nei TCC

Esistono solo dati limitati circa l'espressione di EGF nei carcinomi vescicali. Nel 1984 Messing osservo' che alcune linee cellulari di TCC della vescica andavano incontro ad

una risposta proliferativa in seguito a somministrazione di questo fattore di crescita. In uno studio recente di Ravery (1997) l'espressione di EGF non sembra però rivestire alcun significato prognostico nei TCC vescicali come illustrato nella **tabella 6**.

TGF α nei TCC

L'elevata espressione nei TCC vescicali di TGF α ed EGFR (recettore per il fattore di crescita dell'epidermide) rispetto all'EGF induce a considerare TGF α il ligando principale di EGFR (Mellon et al., 1996). L'espressione immunohistochimica di TGF α ha dimostrato una buona correlazione con lo stadio ed una predittività solo di poco inferiore a quest'ultimo sulla sopravvivenza. La coespressione di TGF α e del suo recettore si correla fortemente con una pessima prognosi come illustrato nella tabella 5 (Ravery et al., 1997).

TGF β nei TCC

L'ipotizzato meccanismo inibitore sulla tumorigenesi esplicito da TGF β emerge dal lavoro di Kubota (1995), dove l'espressione di TGF β -RNA si riscontra prevalentemente nei TCC di basso grado e stadio, diminuendo progressivamente fino ad annullarsi negli stadi avanzati. La correlazione inversa con l'espressione di cmyc-RNA (un attivatore trascrizionale che tratteremo nel capitolo 9) fa ipotizzare che il meccanismo d'azione di TGF β sia quello di inibire i geni deputati alla attivazione della trascrizione (Laiho et al., 1990). Eder e coll. (1997) riportano livelli di TGF β -RNA più bassi nei TCC rispetto al normale urotelio. Resta invece per lo più oscuro il rinvenimento da parte degli stessi autori di elevati livelli sierici di TGF β -RNA negli stessi tumori (Eder et al., 1996).

UTILITA' DEI FATTORI DI CRESCITA NELLA PRATICA CLINICA

Pochi dati sono attualmente disponibili per poter esprimere un giudizio sul potenziale impiego routinario dei marcatori ora descritti. Mentre l'espressione immunohistochimica di EGF appare di scarsa utilità prognostica, gli interessanti risultati preliminari sui TGF

α e β necessitano di ulteriori conferme ad opera di studi che impieghino piu' larghe casistiche.

BIBLIOGRAFIA

Alison M.R., Sarraf C.E. Understanding cancer. Cambridge University Press. 1997.

Eder I.E. et al. Transforming growth factor- β 1 and β 2 in serum and urine from patients with bladder carcinoma. J Urol 1996; 156: 953-957.

Eder I.E. et al. Expression of transforming growth factor beta-1, beta-2 and beta-3 in human bladder carcinomas. Br J Cancer 1997; 75 (12): 1753-1760.

Fukuyama R., Shimizu N. Expression of epidermal growth factor (EGF) and the EGF receptor in human tissues. J Exp Zool 1991; 258: 336-341.

Kubita Y. The loss of retinoblastoma gene in association with c-myc and transforming growth factor β 1 gene expression in human bladder cancer. J Urol 1995; 154: 371-374.

Laiho M. et al. Growth inhibition by TGF- β linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. Cell 1990; 62: 175-179.

Liotta L.A., Steeg P.S. and Stetler-Stevenson W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell 1991; 73: 654-658.

Mellon J.K. et al. Transforming growth factor- α levels in bladder cancer and their relationship to epidermal growth factor receptor. Br J Cancer 1996; 73: 654-658.

Messing E. Growth factors and human bladder tumours. J Urol 1984; 131: 111A.

Ravery D. et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor α , epidermal growth factor and c-erbB2 in the progression of invasive bladder cancer. *Urol Res* 1997; 25: 9-17.

Roberts A.E. and Sporn M.B. The transforming growth factor- β s. In: *Handbook of experimental pharmacology*, 95th ed. New York: Springer Verlag, 1990: pp 419-492.

Wakefield L.M. et al. Roles for transforming growth factor- β in the genesis, prevention and treatment of breast cancer. *Cancer Treat Res* 1992; 61: 97-103.

Yang E.Y. and Moses H. Transforming growth factor beta-1 induced changes in cell migration, proliferation and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J Cell Biol* 1990; 111: 731-736.

CAP. 7: ONCOGENI CHE CODIFICANO PER RECETTORI DI FATTORI DI CRESCITA

STRUTTURA DI UN RECETTORE PER FATTORE DI CRESCITA

I recettori per i fattori di crescita sono situati sulla membrana cellulare e possiedono tutti una struttura comune che consiste di un dominio extracellulare per il legame con il ligando (fattore di crescita), un dominio corto transmembrana ed infine una porzione intracellulare, responsabile dell'inizio della cascata di eventi intracellulari che vengono evocati in seguito all'unione ligando-recettore. La maggior parte di questi recettori deriva da una larga famiglia di cosiddette **proteine tirosina-cinasi** (PTK), molecole ad attivita' enzimatica con la capacita' di catalizzare la fosforilazione dell'aminoacido tirosina nelle proteine bersaglio, con il risultato di attivarle.

I recettori che ci interessano particolarmente per i tumori di cui ci occupiamo, derivano tutti dalla famiglia dei recettori per fattori di crescita di tipo 1, che comprende l'**EGFR** (recettore per l'EGF, detto anche erbB-1, dal nome del gene omonimo), ed i recettori **c-erbB-2** e **c-erbB-3**. L'EGFR, una glicoproteina di 170 Kda, puo' essere preso a paradigma della funzione dei recettori tirosina-cinasi (Alison M.R., 1997). Il proto-oncogene c-erbB2 si trova sul cromosoma 17q e codifica per una proteina transmembrana con significativa omologia ad EGFR (Yamamoto, 1986). Uno specifico ligando per c-erbB2 non e' ancora stato identificato anche se e' probabile che si tratti di una molecola molto simile al TGF α (Lee, 1989).

MECCANISMO D'AZIONE DEI RECETTORI PER I FATTORI DI CRESCITA

Un modello di funzione recettoriale prevede che il legame del fattore di crescita con il dominio extracellulare attivi la funzione tirosina-cinasi del dominio intracellulare. Nel caso di EGFR, il legame con il ligando (sia esso EGF o TGF α) innesca la formazione di un dimero, cosi' che le porzioni intracellulari di due monomeri recettoriali vengano a trovarsi in contatto reciproco. Questa situazione innesca una reazione di

autofosforilazione probabilmente perché ciascun monomero fosforila l'altro in tirosina (**figura 14**). L'ulteriore propagazione del segnale ligando-indotta comprende il riconoscimento e la relativa fosforilazione in tirosina delle proteine membrana-associate, che saranno argomento del prossimo capitolo.

RECETTORI DI FATTORI DI CRESCITA NEL CANCRO

Nel cancro, il meccanismo di trasduzione del segnale che passa attraverso i recettori deve essere in qualche modo “alterato” o meglio amplificato affinché si traduca in un aumento proliferativo. Molte cellule maligne non solo producono più elevate quantità di fattori di crescita, ma sono altresì in grado di incrementare l'espressione dei relativi recettori (cosiddetta up-regulation recettoriale).

- L'iperespressione di EGFR è di comune riscontro in molti tumori umani sia come risultato di amplificazione genica che come aumento della trascrizione del gene normale. Nel caso invece dell'oncogene virale v-erbB (responsabile dell'eritroblastosi aviaria) che codifica per una versione troncata di c-erbB-1 (il gene di EGFR), il recettore manca del dominio extramembrana, sito del legame con l'EGF. Ciò fa sì che la proteina “dimerizzi” in modo spontaneo, in modo che il recettore si trovi in uno stato di costante attivazione.
- L'oncogene c-erbB-2/neu fu rinvenuto per la prima volta nel neuroblastoma di ratto e risultò possedere (rispetto al normale proto-oncogene) una sostituzione di un aminoacido nella porzione transmembrana (mutazione) che ne aumentava la propensione a “dimerizzarsi”. Nell'uomo invece, mutazioni puntiformi di erbB-2 sono alquanto rare, mentre il meccanismo principale dell'attivazione di erbB-2 sembra essere l'amplificazione genica (De Potter, 1990).

RECETTORI PER I FATTORI DI CRESCITA NEI TCC

EGFR nei TCC

Studi molecolari

Uno studio iniziale condotto per mezzo del Southern Blotting ha dimostrato che l'amplificazione del gene per EGFR e' un evento per lo piu' episodico nel carcinoma vescicale, verificandosi in 1 caso su 31 (Berger, 1987). Un'altra casistica ha dimostrato amplificazione genica in 1 caso su 35 utilizzando la PCR (Gorgoulis, 1995). L'iperespressione dell'mRNA al contrario si verifica con una certa frequenza (36%) (Wood, 1992), ad indicare che l'iperespressione di EGFR riflette per lo piu' una aumentata trascrizione di un gene normale.

Studi immunoistochimici

L'utilizzo di 2 anticorpi monoclonali che riconoscono rispettivamente la porzione extracellulare ed intramembrana del recettore non ha evidenziato alcuna discrepanza nell'espressione immunoistochimica dei 2 marcatori, dimostrando cosi' che la forma troncata di EGFR (analoga a v-erbB1) non e' presente nei TCC vescicali.

La **tabella 6** mette in evidenza lo spiccato valore prognostico dell'immunopositivita' per EGFR, un riscontro che trova concordi quasi tutti gli autori eccetto Ravery (1997), il quale pero' prende in esame una casistica di TCC vescicali infiltranti, caratterizzati da un'elevata iperespressione recettoriale. L'immunoreattivita' per EGFR e' un riscontro alquanto frequente anche nel normale urotelio e nelle forme di displasia lieve (Wagner U., 1995). Una crescente positivita' immunoistochimica si correla significativamente con l'indice proliferativo per il Ki67, a conferma del fatto che EGFR condiziona in qualche modo la proliferazione cellulare (Liukkonen, 1997; Neal, 1990).

c-erbB2 nei TCC

Studi molecolari

L'incidenza di amplificazione genica sembra essere piu' elevata per c-erbB2 rispetto ad EGFR. Gorgoulis et al. (1995) hanno dimostrato la presenza di amplificazione del gene nell'11% dei tumori. In un'altra serie di 92 carcinomi vescicali, il 26% presentava amplificazione genica, mostrando una correlazione significativa con il grado e lo stadio patologici (Orlando et al., 1996).

Per contro l'iperespressione della proteina erbB2 e' stata riportata nel 21% (20/95) da altri autori che hanno pero' rinvenuto in un solo caso la presenza di multiple copie del gene mediante Southern Blotting. Questa osservazione, unitamente al riscontro di elevati livelli di mRNA in una significativa proporzione di tumori, suggeriscono che l'amplificazione genica non e' probabilmente il meccanismo primario che rende conto dell'iperespressione della proteina erbB2 (Mellon J.K. et al., 1996).

Studi immunoistochimici

Altresi' controverso appare oggi il ruolo dell'immunoreattivita' per erbB2. Se nella casistica riportata da Mellon (1996) le cellule uroteliali normali non esprimono la proteina, Wagner (1995) nel suo studio sulle lesioni uroteliali premaligne ha rinvenuto con una certa frequenza una positivita' per erbB2 nell'epitelio transizionale seppur ristretta agli strati basali, mentre nei casi di displasia l'immunopositivita' appare diffusa a tutti gli strati. Per questo motivo alcuni autori considerano come positivi solo i preparati in cui la marcatura immunoistochimica sia diffusa (Lipponen P, 1993; Rajkumar T., 1996) (**Fotografia 1**).

I vari studi immunoistochimici differiscono per certi versi nella percentuale di espressione della proteina, ma concordano sostanzialmente nel ritenere che l'iperespressione di erbB2 non abbia alcun valore prognostico (**tabella 7**). Addirittura in due studi relativamente recenti la presenza marcata di erbB2 nei tumori vescicali si correlerebbe in modo inverso con la prognosi (Nguyen, 1994; Ravery, 1997). Gli autori in questione sostengono che la perdita dell'espressione di erbB2 potrebbe riflettere un cambiamento nel fenotipo cellulare in senso aggressivo.

A conferma di queste perplessita', l'espressione di erbB2, contrariamente a quanto potremmo aspettarci da un recettore per fattore di crescita, non si correla in alcun modo con l'intensita' proliferativa dei tumori vescicali valutata per mezzo del Ki67 (Moch H., 1994).

Nell'unico studio che prende in esame c-erbB3 nei TCC, questo marcatore non risulta in alcun modo correlato ne' con erbB2 ne' con il grado di differenziazione della neoplasia (Rajkumar, 1996).

Anche nei TCC della pelvi erbB2 riveste scarso significato prognostico. Bjerkehagen e coll. (1995) non hanno riscontrato alcuna immunoreattività pur utilizzando i comuni kits anticorpali. Imai e coll. (1995) pur ipotizzando un potenziale ruolo prognostico sulla recidiva in 30 TCC pelvici ed ureterali quando erbB2 e' coespresso con EGFR, hanno constatato una sostanziale assenza di relazione tra immunoreattività ed il grado/stadio patologici.

UTILITA' CLINICA DEI RECETTORI PER FATTORI DI CRESCITA NEI TCC

1. L'iperpressione di erbB2, lungi dall'averne un significato predittivo sulla progressione tumorale, parrebbe al contrario essere un marcatore di buona prognosi. La sostanziale identità di conclusioni da parte di numerosi studi scoraggia sia l'utilizzo routinario di questo marcatore nella diagnostica che l'approntamento di ulteriori studi.
2. L'EGFR appare invece alquanto promettente in quanto ad utilità prognostica. La buona correlazione con lo stadio patologico e con l'attività proliferativa del tumore ne fanno in linea di principio un valido marcatore. Il suo significato prognostico sulla sopravvivenza non e' però da tutti condiviso. Vista la scarsa disponibilità di lavori con casistiche rilevanti, merita senz'altro ulteriori approfondimenti in vista di un suo possibile utilizzo clinico.

BIBLIOGRAFIA

Alison M.R. and Sarraf C.E. Understanding cancer. Cambridge University Press. 1997.

Berger M.S. et al. Evaluation of epidermal growth factor receptors in bladder tumours. Br J Cancer 1987; 53: 533-537.

Bjerkehagen B. et al. Transitional cell carcinoma of the renal pelvis and its expression of p53 protein, c-erbB-2 protein, neuron-specific enolase, PHE 5, chromogranin, laminin and collagene type IV. Eur urol 1994; 26: 334-339.

De Potter C.R. et al. The neurooncogene protein as a predictive factor for haematogenous metastases in breast cancer patients. *Int J Cancer* 1990; 45: 55-61.

Gorgoulis V.G. et al. Molecular and immunohistochemical evaluation of epidermal growth factor receptor and erbB2 gene product in transitional cell carcinoma of urinary bladder: a study in Greek patients. *Modern Pathol* 1995; 8: 758-764.

Imai T. et al. Significance of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 protein expression in transitional cell cancer of the upper urinary tract for tumour recurrence of the urinary bladder. *Br J Cancer* 1995; 71: 69-72.

Lee J. et al. HER2 cytoplasmatic domain generate normal mitogenic and transforming signals in a chimeric receptor. *EMBO J* 1989; 8: 167-173.

Lipponen P. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in transitional cell bladder cancer. *Eur J Cancer* 1993; 29A (5): 749-753.

Lipponen P. and Eskelinen M. Expression of epidermal growth factor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *Br J Cancer* 1994; 64: 1120-125.

Liukkonen V. et al. Immunoreactivity of bcl-2, p53 and EGFR is associated with tumour stage, grade and cell proliferation in superficial bladder cancer. *Urol Res* 1997; 25: 1-8.

Mellon J.K. et al. C-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J Urol* 1996; 155: 321-326.

Moch H. et al. p53 but not erbB-2 expression is associated with rapid tumor proliferation in urinary bladder cancer. *Human Pathol* 1994; 25: 12-17.

Neal D.E. et al. Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet* 1985; i: 366-368.

Neal D.E. et al. The epidermal growth factor receptor and the prognosis in bladder cancer. *Cancer* 1990; 65: 1619-1625.

Nguyen P.C. et al. Expression of epidermal growth factor receptor in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a multivariate survival analysis. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 166-169.

Orlando C. et al. Detection of ERB-2 amplification in transitional cell bladder carcinoma using competitive PCR technique. *J Urol* 1996; 156: 2089-2093.

Rajkumar T. et al. Expression of the type 1 tyrosine kinase growth factor receptors EGF receptor, c-erbB-2 and c-erbB-3 in bladder cancer. *J Pathol* 1996; 179: 381-385.

Ravery V. et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor α , epidermal growth factor and c-erbB2 in the prognosis of invasive bladder cancer. *Urol Res* 1997; 25: 9-17.

Swanson P.E., Frierson H.P. and Wick M.R. c-erbB-2 (HER-2/neu) oncoprotein immunoreactivity in localized high grade transitional cell carcinoma of the bladder. *Mod Pathol* 1992; 5: 531-536.

Wagner V. et al. Patterns of p53, erbB-2 and EGFR expression in premalignant lesions of the urinary bladder. *Human Path* 1995; 26: 9-16.

Wood D.P. Jr, Fair W.R. and Chaganti R.S. Evaluation of epidermal growth factor receptor DNA amplification and mRNA expression in bladder cancer. *J Urol* 1992; 147: 274-277.

Wright C. et al. Expression of p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor intratransitional cell carcinoma of the human bladder cancer. Br J Cancer 1991; 63: 967-970.

Yamamoto T. et al. Similarity of protein encoded by the human erbB2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature 1986; 319: 230-234.

CAP. 8: ONCOGENI CHE CODIFICANO PER PROTEINE ENZIMATICHE DEL CITOPLASMA

INTRODUZIONE

Abbiamo anticipato nel capitolo precedente come, a seguito dell'autofosforilazione di un recettore per fattore di crescita, la trasmissione del segnale sia mediata dall'attivazione di svariati gruppi di proteine citoplasmatiche che interagiscono in una sorta di reazione a cascata culminante nell'espletazione di una precisa funzione cellulare. Tipico è l'esempio della fosfolipasi C, enzima chiave nel processo di regolazione del calcio intracellulare e degli scambi ionici di Na⁺ e K⁺.

La cascata citoplasmatica che in particolare ci interessa è quella che passa attraverso l'attivazione della proteina codificata da un oncogene chiamato RAS, poiché è una delle principali (forse la meglio definita a tutt'oggi) vie di trasmissione di un segnale proliferativo cellulare e perché tutte le proteine che ne fanno parte possono essere potenzialmente alterate nei tumori (proteine oncogeniche).

LA CASCATA DI EVENTI RAS-DIPENDENTI CHE TRASPORTANO UN SEGNALE PROLIFERATIVO DAL RECETTORE AL NUCLEO

La **figura 15** riassume le tappe principali della via di comunicazione membrana cellulare-nucleo cosiddetta RAS-dipendente per la posizione di centralità occupata da questo oncogene.

Un modello funzionale di questa via prevede che, a seguito dell'attivazione del **recettore** (ad esempio l'autofosforilazione di EGFR), vengano reclutati una serie di enzimi citosolici caratterizzati dall'aver tutti un dominio SH2, una regione di 100 aminoacidi circa che prende il nome dal fatto di essere omologa a quella riscontrata sulla proteina src (src-homology-2) e che ha la proprietà di legare residui di fosfotirosina. Il primo enzima ad essere attivato dal recettore è **Grb2**, il cui dominio SH2 riconosce un corto peptide

recettoriale contenente fosfotirosina e va così a legarsi ad esso. Grb2 contiene poi anche diversi domini cosiddetti SH3 (sempre omologhi a rispettive regioni rinvenute per la prima volta nella proteina src), che hanno la proprietà di legare dei peptidi ricchi in residui di prolina. Il dominio SH3 di Grb2 è così in grado di legare un “fattore di scambio del nucleotide guanina” detto **SOS**, ricco appunto in residui di prolina. Si viene così a costituire un complesso eterotrimerico recettore-Grb2-SOS che è in grado a questo punto di attivare **RAS**.

RAS a sua volta permette l'attivazione della proteina serina/treonina chinasi **RAF**. Come vedremo più avanti, questo non avviene in modo diretto, ma prevede l'intervento della proteina **src**, la quale attiva RAF fosforilandola in serina/treonina. RAF attivato media a sua volta l'attivazione per fosforilazione in serina/treonina di un enzima, la **MAP chinasi chinasi**, così detta per il fatto di catalizzare la fosforilazione (questa volta in tirosina/treonina) dell'enzima **MAP chinasi**.

Vi sono almeno due tipi di MAP chinasi, ed entrambe sembrano essere dei punti chiave nella trasduzione del segnale proliferativo. Il nome MAP deriva dalla loro identificazione come chinasi attivate da stimoli mitogeni (mitogen activated protein). Le MAP chinasi hanno diversi “targets”: ad esempio possono attivare altre chinasi citosoliche la cui funzione è oggi sconosciuta, fosforilandole in serina/treonina. Ma la proprietà più interessante consiste nel fatto che questi enzimi attivati sono in grado di traslocare dentro il nucleo cellulare e fosforilare direttamente alcuni fattori trascrizionali quali myc e jun.

La cascata RAS-mediata termina così con la trasduzione del segnale al nucleo cellulare dove appunto vengono regolate le funzioni di proliferazione e differenziazione cellulare. La maggior parte delle proteine che veicolano il segnale lungo questa via è codificata da oncogeni, la cui alterazione, come appare ora ben chiaro, può provocare disastrose conseguenze sull'equilibrio cellulare.

Prenderemo in considerazione gli elementi di questa cascata che più frequentemente sono alterati nei tumori ed in particolare nei TCC.

RAS

Definizione

La superfamiglia RAS comprende una serie di proteine (**p21^{RAS}**), intimamente correlate tra loro, che condividono la capacità di legare il guanosin-trifosfato (GTP) e di idrolizzarlo in guanosin-difosfato (GDP). Sono quindi delle proteine con funzione GTP-asi, dal peso molecolare di 21Kda, attaccate alla parete interna della membrana cellulare. Il nome deriva dal fatto che questo oncogene fu scoperto in retrovirus che provocano il sarcoma nel topo (rat sarcoma). Tre geni cellulari sono stati sinora mappati e siglati rispettivamente come c-H-ras, c-K-ras e c-N-ras.

Funzione fisiologica

Quando RAS è legato al GDP si trova nella forma inattiva. Il legame con il GTP lo rende attivo fino a quando non avviene l'idrolisi in GDP. Come viene "attivato" RAS fisiologicamente? È probabile che la proteina Grb2 stimoli lo scambio di GDP con una molecola di GTP (**figura 16 A**). A questo punto RAS è in grado di svolgere la sua funzione che consiste nel "catturare" la proteina RAF dal citoplasma e portarla sulla superficie interna della membrana, dove verrà attivata per fosforilazione dalla proteina src (**figura 16 B**). L'idrolisi del GTP in GDP ad opera di un'attività GTPasica intrinseca di RAS fa tornare l'enzima nella sua forma inattiva.

Nel citoplasma delle cellule esistono anche delle proteine attivatrici dell'attività GTP-asi di RAS, le cosiddette **GAPs** (GTP-ase activating proteins), in grado di accelerare il processo di inattivazione di RAS (**figura 16 C**). Ne sono note almeno 2, una delle quali, la **p280^{NF1}**, è codificata dal gene **NF1** (Alison M. and Sarraf C., 1997).

Attivazione dell'oncogene RAS nel cancro

Sono stati ipotizzati sinora 3 modi per aumentare l'attività oncogenica di RAS e quindi stimolare la cellula in senso neoplastico:

1. una singola mutazione puntiforme a carico di uno dei 3 geni sembra essere in grado di ridurre l'attività GTP-asi intrinseca di p21^{RAS}, con conseguente aumento dell'attività della forma attiva. Mutazioni puntiformi dell'oncogene RAS si riscontrano in circa il 40% dei tumori umani.

2. Un altro modo per aumentare l'attività di RAS è quello di iperstimolare la proteina Grb2 attraverso l'attivazione di ciò che sta a monte di essa (recettore e fattore di crescita).
3. Infine la durata della forma attiva di RAS può essere incrementata semplicemente inattivando le proteine GAPs. L'inattivazione di una di esse, la p280^{NF1} è responsabile di una patologia nota come neurofibromatosi di tipo 1 (o malattia di von Recklinghausen), un disordine ereditario in cui gli individui colpiti sono a rischio di sviluppare alcuni tumori, particolarmente a carico dei nervi periferici. NF1 può essere altresì inattivato sporadicamente in molti altri tumori umani ed è stato anche oggetto di studio nei TCC (Lewin B., 1996)

SRC

Definizione

Il gene src codifica per una fosfoproteina di 60kda (**pp60^{c-src}**) la quale si trova generalmente associata alla superficie interna della membrana plasmatica. Il gene deriva il nome dal fatto di essere l'omologo cellulare di v-src, oncogene virale in grado di provocare il sarcoma di Rous nei polli.

Struttura e funzione

Src fa parte di una famiglia di geni che codificano per delle proteine cinasi caratterizzate per avere alcune regioni o domini in comune che abbiamo già descritto come SH1, SH2 ed SH3. **SH1** è il dominio dell'attività cinasica. **SH2** è invece la regione proteica di 100 aminoacidi in cui si trova il sito di legame per le proteine che, trovandosi a monte della cascata, attivano src (una di queste è il recettore per fattore di crescita). **SH3** costituisce invece il sito effettore di src, che si lega alle proteine che stanno a valle.

Come già ricordato, la funzione di src è quella di fosforilare in tirosina la proteina RAF attivandola (**figura 15**). Un'altra funzione di src sembra essere quella di mediare modificazioni del citoscheletro che portano ad una riduzione dell'adesività cellulare.

Attivazione dell'oncogene src nel cancro

Sono note mutazioni a carico del dominio SH3 in grado di iperattivare RAF, inducendo così la trasformazione cellulare. Le connessioni di src con il citoscheletro pongono infine la proteina in una posizione cruciale nel promuovere la perdita dell'adesività cellulare che è un fattore favorente la metastatizzazione della cellula (Alison M.R., 1997).

VALORE PROGNOSTICO DELLE PROTEINE ONCOGENICHE CITOPLASMATICHE NEI TCC

RAS nei TCC

Studi molecolari

L'oncogene RAS mutato fu isolato per la prima volta proprio da linee cellulari di carcinoma vescicale umano, utilizzando la tecnica della transfezione in fibroblasti di topo (Pulciani et al., 1982). Mediante le tecniche di sequenziamento si vide che l'oncogene responsabile della trasformazione dei fibroblasti di topo era identico al proto-oncogene c-H-ras di una cellula normale fatta eccezione per una singola sostituzione nucleotidica (Reddi E.P., 1982). Ben presto si rinvennero anche linee cellulari contenenti c-N-ras mutato (Boss J.L., 1989). Da allora numerosi studi molecolari sono stati condotti con lo scopo di determinare la frequenza e l'eventuale valore prognostico delle mutazioni di RAS nei TCC. Gli studi iniziali, condotti con la tecnica della transfezione (che ha lo svantaggio di essere scarsamente riproducibile), riportavano una frequenza di mutazioni variabile dal 7 al 20% (Fujita J., 1985; Pulciani S., 1987).

Con l'avvento delle PCR lo studio di RAS ha deluso quelle che erano le aspettative iniziali. La **tabella 8** riassume i contributi della più recente letteratura. Da un'analisi sommaria dei risultati si vede come le mutazioni di RAS coinvolgano prevalentemente il gene H-RAS e siano per lo più infrequenti (generalmente non superiori al 10%). Lo screening di mutazioni dell'oncogene nel sedimento urinario è da alcuni considerato un buon complemento dell'esame citologico (Fitzgerald, 1993) oltre che una metodica di agevole applicazione (Cristaudo A., 1997), sebbene l'incidenza di mutazioni nelle poche casistiche sinora disponibili sia troppo variabile (7-76%).

Uno dei modi con cui RAS può esercitare la sua azione oncogena è quello di aumentare la trascrizione della sua normale proteina. Vangeli e coll. (1996) hanno rinvenuto una

elevata frequenza di iperespressione dell'RNA di RAS (rispettivamente 39% per H-ras e 58% per K-ras ed N-ras) in 26 tumori vescicali, indicando un meccanismo alternativo alla mutazione operante nella carcinogenesi vescicale.

Studi immunoistochimici

Il presupposto per l'iperespressione immunoistochimica di p21 potrebbe risiedere in un'aumentata emivita a seguito della mutazione oppure in una ipertraduzione del gene normale.

In una revisione sull'utilità prognostica della determinazione immunoistochimica di p21 nei tumori umani, Gulbis e coll. (1993) hanno classificato la vescica tra quei tessuti per i quali non è possibile trarre alcuna conclusione definitiva. Alla base di questa affermazione vi sono innanzitutto i risultati contraddittori della letteratura riguardo la positività della p21 sia nel tessuto uroteliale normale che neoplastico, originati forse dalla diversa specificità di diversi kit anticorpali. Se Viola (1985) riporta una positività per la p21 sia nel tessuto normale che neoplastico, alcuni studi successivi identificano la p21 esclusivamente in cellule tumorali (Ting-Jie, 1995; Fontana D., 1996). Anche il valore prognostico di p21 rimane tuttora dibattuto (Meyers, 1989; Viola, 1985; Ding-Wei, 1993). Solo Fontana (1996) riporta una significativa capacità predittiva sulla recidiva dell'espressione di p21 nei TCC vescicali superficiali (Fontana D., 1996).

Significato clinico di RAS nei TCC

1. L'incidenza di mutazioni dell'oncogene RAS nei TCC è un evento infrequente e come tale gioca un ruolo poco rilevante nella tumorigenesi di questa neoplasia. Per di più nessuno studio molecolare è riuscito ad attribuire un valore prognostico alla mutazione del gene.
2. L'espressione del prodotto proteico di RAS è stato sinora poco studiato e pertanto non si possono trarre conclusioni.
3. Al momento attuale quindi l'oncogene RAS non ha alcun posto nella pratica clinica dei TCC.

SRC nei TCC

Il protooncogene c-src è risultato essere implicato nel processo neoplastico di molti tumori umani, dove un'aumentata attività proteina-cinasi si è vista essere associata

allo stato di differenziazione di tumori neuroectodermici (Rosen N., 1996) e come evento precoce nei tumori del colon (Cartwright, 1990).

Nell'unico studio sinora disponibile sui TCC, l'espressione della proteina pp60^{c-src}, testata con la metodica del Western Blotting, e' risultata essere inversamente proporzionale al grado di differenziazione del tumore, cioe' di gran lunga maggiore nei bassi gradi (80% di positivita') rispetto ai tumori scarsamente differenziati. Similmente a studi condotti su altri tumori, aumentati livelli di proteina si correlano parzialmente con un incremento dell'attivita' cinasica della proteina (Fanning P., 1992). L'attivazione del protooncogene src per mutazione e' un'ipotesi attraente, sebbene altri meccanismi quali l'amplificazione o l'ipertraduzione genica non possano essere esclusi.

Per il momento non vi e' alcun dato disponibile su un ruolo prognostico di src nei TCC.

NF nei TCC

Recentemente mutazioni puntiformi acquisite somaticamente a carico di NF1 sono state osservate nel DNA di carcinomi del colon e di astrocitomi (Li Y., 1992). L'attivita' GAP della forma mutata di NF-1 e' risultata essere 200-400 volte inferiore a quella del gene normale. Nessuna mutazione a carico di NF-1 e' stata invece osservata nei 39 TCC studiati da Uchida et al. (1995).

RAF e MAP nei TCC

Non vi sono al momento studi che abbiano preso in considerazione questi oncogeni nei tumori vescicali.

BIBLIOGRAFIA

Alison M.R., Sarraf C. E. Understanding Cancer. Cambridge University Press. 1997.

Boss J. L. Ras oncogenes in human cancers: a review. Cancer Res 1989; 49: 4682-4691.

Burchill S. A., Neal D. E. and Lunec J. Frequency of H-ras mutations in human bladder cancer detected by direct sequencing. Br J Urol 1994; 73: 516-521.

Cartwright C. A., Meisler A. L. and Eckhart W. Activation of the pp60^{c-src} protein kinase is an early event in colonic carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 3348-3352.

Cristaudo A. A simple method to reveal possible ras mutations in DNA of urinary sediment cells. J Environ Pathol Toxicol Onc 1997; 16: 201-204.

Ding-Wei Y. et al. Correlation between the expression of oncogene ras and c-erb-B-2 and the biological behavior of bladder tumor. Urol Res 1993; 21: 39-43.

Fanning P. et al. Elevated expression of pp60^{c-src} in low grade human bladder carcinomas. Cancer Res 1992; 52: 1457-1462.

Fitzgerald J. M. et al. Identification of H-ras mutations in urine sediments complements cytology in the detection of bladder tumours. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 129-133.

Knowles M. and Williamson M. Mutation of H-ras is infrequent in bladder cancer: configuration by single-strand conformation polymorphism analysis, designed restriction fragment length polymorphisms and direct sequencing. Cancer Res 1993; 53: 133-139.

Fontana D. et al. Evaluation of c-RAS oncogene product (p21) in superficial bladder cancer. Eur Urol 1996; 29: 470-476.

Fujita J. et al. Frequency of molecular alterations affecting ras protooncogenes in human urinary tract tumours. Proc Natl Acad Sci 1985; 82: 3849-3853.

Gulbis B. and Galaud P. Immunodetection of the p21 ras product in human normal and preneoplastic tissues and solid tumours: a review. Hum Pathol 1993; 24 (12): 1271-1285.

Lewin B. Genes VI. Oxford University Press. 1997.

Meyers F. J. et al. Human bladder and carcinomas controinactivated ras p21. *Cancer* 1989; 63: 2177-2181.

Ooi A. et al. Ha-ras codon 12 mutation in papillary tumours of the urinary bladder: a retrospective study. *Int J Onc* 1994; 4: 85-90.

Pulciani S. et al. Oncogenes in solid tumors. *Nature* 1982; 300: 539-542.

Pulciani S. et al. Oncogenes in human tumour cell lines: molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 79: 2845-2849.

Reddi E. P. et al. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 1982; 300: 149-152.

Rosen N. et al. Analysis of pp60^{c-src} protein kinase activity in human tumor cell lines and tissue. *J Biol Chem* 1986; 261: 13754-9.

Saito S. et al. Screening of H-ras gene point mutations in 50 cases of bladder carcinoma. *Int J Urol* 1997; 4(2): 178-185.

Ting-Jie M., Ze W. and Nianli S. Correlation between the expression of the p21 ras oncogene product and biological behavior of bladder tumor. *Eur Urol* 1991; 20: 307-310.

Uchida T. et al. Infrequent involvement of mutations on Neurofibromatosis type 1, H-ras, K-ras and N-ras in urothelial tumours. *Urol Int* 1995; 55: 63-67.

Vangeli D. et al. Transcriptional activation of H-ras, K-ras and N-ras proto-oncogenes in human bladder tumours. *Cancer Lett* 1996; 107: 241-247.

Viola M. V. et al. Ras oncogene p21 expression is increased in premalignant lesion and high grade bladder carcinoma. *J Exp Med* 1985; 161: 1213-1218.

CAP. 9: ONCOGENI CHE CODIFICANO PER PROTEINE NUCLEARI (COSIDDETTI ATTIVATORI DIRETTI DELLA TRASCRIZIONE)

INTRODUZIONE

Abbiamo detto che e' necessario un cambiamento nell'espressione genica per convertire una cellula in un fenotipo trasformato. Gli oncogeni sinora descritti agiscono nell'ambito della cascata di eventi che media in modo indiretto le variazioni nell'espressione genica. Al contrario gli oncogeni di cui ci occupiamo in questo capitolo codificano per delle proteine localizzate nel nucleo cellulare ed in grado quindi di agire direttamente a livello della trascrizione genica. Quando una cellula in fase di riposo (G1 del suo ciclo) viene trattata con sostanze mitogene, si assiste ad un aumento nell'espressione di questi geni.

c-MYC

Definizione

Myc e' stato uno dei primi oncogeni nucleari ad essere caratterizzato, isolato da retrovirus della mielocitomatosi (da cui il relativo acronimo) che provocano una forma di leucemia mieloide nei polli. Fa parte di una famiglia di geni che comprende N-myc (isolato da cellule di neuroblastoma) ed L-myc (riscontrato per la prima volta in carcinomi polmonari a piccole cellule). I geni myc codificano tutti per una proteina di 62 Kda (p62) (Alison M.R., 1997).

Funzione

Elevati livelli di p62 sono presenti nelle cellule proliferanti. La proteina p62 contiene regioni ricche di aminoacidi basici, suggestivi della presenza di un sito di legame per il DNA. Generalmente la proteina myc forma degli eterodimeri con un'altra proteina di 18 Kda detta MAX ed i complessi myc-MAX agiscono come fattori trascrizionali con capacita' legante il DNA (Ayer D. E., 1993). Da studi recenti sembra inoltre che l'iperpressione di c-myc sia in grado di promuovere non solo la proliferazione cellulare

(Evan, 1993) ma anche l'apoptosi, per il quale argomento si rimanda al capitolo 19 (Koskinen, 1993).

Attivazione dell'oncogene myc nel cancro

L'oncogenicit  di c-myc deriva dalla sua iperespressione, che puo' attuarsi in 4 modi:

1. Inserimento di un retrovirus non difettivo nelle vicinanze del gene, con conseguente ipertraduzione del gene normale ad opera dei promotori virali. Questo meccanismo pare pero' ristretto alla leucemia mieloide aviaria.
2. Traslocazione del protooncogene nella regione cromosomica dove normalmente il gene per le immunoglobuline (Ig) viene attivamente tradotto. In tal modo myc viene ipertradotto dai promotori dei geni per le Ig. E' cio' che succede nel linfoma di Burkitt.
3. Amplificazione genica, che sembra essere il meccanismo piu' comune nei tumori umani (Lewin, 1996).
4. La modificazione del gene myc in seguito ad alterazione del normale meccanismo di metilazione del DNA e' stata correlata da alcuni con la progressione tumorale. La spiegazione di questo fenomeno e' ancora poco chiara, anche se si ipotizza che una ipometilazione a carico di questo gene possa essere responsabile di un incremento dell'attivita' di trascrizione (Palitti F., 1993).

FOS e JUN

Sono due geni che codificano per delle proteine con funzione di attivatori trascrizionali, caratterizzati dalla presenza di specifici siti di legame per il DNA.

Il prodotto del gene fos e' una fosfoproteina di 55 kda (**p55^{c-fos}**) la cui espressione aumenta dopo pochi minuti dall'applicazione di uno stimolo proliferativo alla cellula. In alcuni retrovirus che contengono fos (quali ad esempio il virus dell' FBT osteosarcoma murino), il gene puo' essere alterato in modo che l'mRNA di fos risulti maggiormente stabile.

Recentemente si e' visto che il prodotto proteico di fos puo' formare complessi con la proteina del gene jun per costituire un fattore trascrizionale noto come **AP-1** (Alison M.R., 1997).

VALORE PROGNOSTICO DEGLI ONCOGENI NUCLEARI NEI TCC

MYC nei TCC

Studi molecolari

L'espressione di c-myc nei TCC vescicali non e' stata sinora studiata in modo estensivo. Nei tumori solidi umani l'iperespressione di c-myc e' piu' frequentemente provocata da un'amplificazione genica o da un'aumentata trascrizione (Spencer C. A., 1991). Nel recente studio di Schmitz-Drager e coll. (1997) il numero di copie del gene myc non e' pero' risultato significativamente aumentato nelle linee cellulari di TCC vescicale prese in considerazione. Similmente, in uno studio comparativo sull'amplificazione genica negli uroteliomi attuato utilizzando la FISH (una tecnica di ibridizzazione in situ con fluorescenza che verra' spiegata nel capitolo 11), una chiara amplificazione genica e' stata riscontrata in 3 su 8 tumori (Sauter, 1995).

Pertanto l'iperespressione della proteina myc nei TCC potrebbe risiedere nella deregolazione dell'espressione genica. Del Senno e coll. (1989) hanno riportato cambiamenti nella metilazione di c-myc nei TCC avanzati. Una significativa correlazione tra ipermetilazione genica e grado istologico e' stata riscontrata da Sardi e coll. (1997), anche se ulteriori studi sono necessari per chiarire il meccanismo d'azione coinvolto.

Studi immunoistochimici

Lipponen e coll. (1995) riportano una percentuale di positivita' per la proteina p62 del 35% in 185 TCC vescicali indagati con le tecnica immunoistochimica. Nonostante la buona correlazione con l'espressione di erbB-2, l'iperespressione della proteina myc non si correla ne' con lo stadio ne' con la prognosi. Masters e coll. (1988) in uno studio precedente riportano una correlazione dell'iperespressione di p62 con la recidiva/progressione dei TCC vescicali, riscontrando livelli proteici significativamente ridotti nei tumori a cattiva prognosi. La metodica citoflussimetrica utilizzata in questo caso non consente pero' il confronto con gli studi immunoistochimici.

Schmitz-Drager (1997) concorda con Lipponen nell'assenza di correlazione tra iperespressione di c-myc ed il grado o la progressione tumorali. In una casistica di 65 tumori papilliferi la positività per la p62 è risultata essere del 58%, mentre l'iperespressione di myc è altresì presente in un caso su 16 campioni di urotelio normale.

JUN nei TCC

L'immunoreattività per l'oncoproteina jun è stata riscontrata nella maggior parte dei TCC vescicali senza però correlarsi con i tradizionali indici prognostici (Timiacos, 1994).

BIBLIOGRAFIA

Alison M. and Sarraf C. Understanding cancer. From basic science to clinical practice. Cambridge University Press. 1997.

Ayer D.D., Eisenman R.N. A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. Genes Dev 1993; 7: 2110-2119.

Del Senno et al. Differential hypomethylation of the c-myc protooncogene in bladder cancers at different stages and grades. J Urol 1989; 142: 146-152.

Evan G.I., Littlewood T.D. The role of c-myc in cell growth. Curr Opin Genet Dev 1993; 3: 44-49.

Koskinen P.J., Alitala K. Role of myc amplification and overexpression in cell growth, differentiation and death. Semin Cancer Biol 1993; 4: 3-12.

Lewin B. Genes VI. Oxford University Press. VI Ed. 1996.

Lipponen P. K. Expression of c-myc protein is related to cell proliferation and expression of growth factor receptors in transitional cell bladder cancer. *J Pathol* 1995; 175: 203-210.

Masters J. R. W. et al. C-myc oncoprotein levels in bladder cancer. *Urol Res* 1988; 16: 341-348.

Palitti F. et al. DNA hypometylation and differentiation in Friend leukemia cell variants. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1216: 50-54.

Sardi I. Et al. Abnormal c-myc oncogene DNA methylation in human bladder cancer: possible role in tumor progression. *Eur Urol* 1997; 31: 224-230.

Sauter G. et al. C-myc copy number gain in bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 1995; 146: 1131-1139.

Schmitz-Drager B. J. et al. C-myc in bladder cancer. Clinical findings and analysis of mechanisms. *Urol Res* 1997; 25 (1): 45-49.

Spencer C. A. and Grondine M. Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 1991; 56: 1-8.

Timiakos et al. C-jun oncogene expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Urol* 1994; 74: 757-761.

CAP. 10: GENI SOPPRESSORI DI TUMORE

INTRODUZIONE

Nel capitolo 3 abbiamo ricordato come uno dei meccanismi largamente implicati nella tumorigenesi sia la perdita di funzione dei cosiddetti geni soppressori di tumore (G.S.T.). Abbiamo anche accennato come il presupposto essenziale per inattivare questi geni sia un'alterazione di entrambi gli alleli (contrariamente agli oncogeni, dove e' sufficiente una mutazione che attivi anche uno solo degli alleli).

L'inattivazione di un G.S.T. puo' verificarsi essenzialmente in 3 modi:

1. delezione genica a carico di entrambi gli alleli
2. delezione di un allele + mutazione dell'altro allele
3. mutazione di entrambi gli alleli

La **tabella 9** schematizza le caratteristiche dei principali G.S.T. studiati in particolare nei TCC. Il G.S.T. NF1 e' stato gia' trattato nel capitolo 8 assieme all'oncogene RAS.

GENE DEL RETINOBLASTOMA (RB)

Definizione

Il gene Rb, localizzato sul cromosoma 13 fu il primo G.S.T. ad essere caratterizzato (Sparkes et al., 1980). Codifica per una fosfoproteina nucleare di peso molecolare 105 Kda che gioca un ruolo cruciale nella regolazione del ciclo cellulare. Per questo motivo il gene, che mutua il suo nome dal fatto di essere il *primum movens* nello sviluppo del relativo tumore retinico, e' altresì coinvolto nello sviluppo di numerosi altri tumori, tra cui anche gli uroteliomi (Qureshy K.H. et al., 1998).

Funzione fisiologica

La proteina da esso codificata (proteina RB) esiste essenzialmente sotto due forme. Nelle cellule in fase non replicativa (fasi G0 o G1 del ciclo cellulare) essa si trova nello stato non fosforilato e pertanto e' in grado di legare il fattore trascrizionale E2F (una proteina che mutua il nome dall' *early gene 2 factor* di adenovirus) impedendone il normale

funzionamento. E2F svolge infatti parte attiva nella trascrizione di geni che favoriscono il passaggio delle cellule dalla fase G1 alla fase S. Quindi il RB non fosforilato inibisce la proliferazione cellulare. L'iperfosforilazione di Rb (seconda forma) al termine della fase G1 del ciclo cellulare permette invece il rilascio di E2F, con l'effetto di favorire la progressione della cellula nel ciclo replicativo (Alison M. e Sarraf C., 1997).

Perdita di funzione del gene RB nel cancro

Mentre nel retinoblastoma familiare l'individuo colpito eredita una mutazione e/o una delezione di un allele dalle cellule germinali (che sarà quindi presenti in tutte le cellule dell'organismo) e poi sviluppa la malattia quando casualmente in un tipo cellulare si verifica una mutazione del rimanente allele sano, nella maggior parte dei tumori, che sono ad andamento sporadico, mutazioni e/o delezioni di entrambi gli alleli possono verificarsi casualmente in qualsiasi tipo cellulare (sempre però con una maggior frequenza a carico dei retinoblasti del bambino).

L'inattivazione della funzione genica, spesso documentabile a livello molecolare dal riscontro di mutazioni geniche (Miyamoto, 1995) e/o dalla perdita di eterozigosi nello specifico locus genico (Miyamoto, 1996) oppure a livello immunostochimico dall'assenza di immunoreattività per la proteina (che non viene codificata poiché il gene non funziona) (Cordon Cardo et al., 1992), fa sì che il fattore E2F si trovi costantemente attivo e quindi in grado di iperstimolare la proliferazione cellulare.

Valore prognostico del gene RB nei TCC vescicali

Studi molecolari

La perdita dell'eterozigosi (LOH) al locus genico del RB è presente in una significativa percentuale di tumori vescicali e sembra correlarsi con il grado di invasione muscolare (Cairns et al., 1991). Analoghi risultati vengono riportati da Miyamoto (1996) che nella sua casistica di 45 TCC vescicali riscontra LOH per il RB esclusivamente nelle forme infiltranti in una percentuale del 22%. Le tecniche di sequenziamento hanno evidenziato mutazioni anche a carico dell'allele superstite (Miyamoto et al., 1995), dimostrando così l'inattivazione completa della funzione genica.

Studi immunostochimici

Il prodotto proteico del RB e' costantemente evidenziabile nelle cellule uroteliali normali mediante tecniche immunoistochimiche, con una immunopositivita' di solito molto marcata (Cordon Cardo et al., 1977). Per contro, la LOH del gene si accompagna ad una perdita dell'espressione della proteina (Xu et al., 1993).

La percentuale di immunonegativita' nei TCC vescicali riferita dai vari autori e' alquanto variabile. Secondo Cordon Cardo (1997) si attesta attorno al 19% in una casistica di 59 pazienti e si correla con grado, stadio, progressione e ridotta sopravvivenza. In una vasta serie prodotta da Tetu et al. (1996), il 16% dei TCC vescicali che non esprimono la pRB sono di grado elevato, benché nessuna correlazione possa dimostrarsi con la tendenza a recidivare.

Lipponen (1995) prende in considerazione l'alterata espressione di RB in un gruppo di 222 TCC vescicali, distinguendola in assente (6%) e "debole" (40%). Pur notando una correlazione con una pessima prognosi, conclude che questo marcatore non e' pero' in grado di fornire maggiori informazioni rispetto ai fattori prognostici tradizionali in termini di sopravvivenza. Due studi precedenti (Cordon Cardo, 1992; Logothetis, 1992) enfatizzano invece una chiara associazione tra perdita di espressione per pRB e ridotta sopravvivenza.

A creare ulteriore confusione e' uno studio recente secondo il quale non solo l'assenza di immunoreattivita' ma bensì anche una marcata iperespressione della proteina pRb sarebbero da ascrivere ad un malfunzionamento della funzione genica. Alla base di questa suggestiva ipotesi stanno la correlazione altamente significativa tra i tumori con pRB assente e con pRB iperespressa sia con la progressione tumorale che con la recidivita'. Gli autori suggeriscono che la marcata positivita' di pRB potrebbe riflettere semplicemente una significativa presenza della forma iperfosforilata (e quindi inattiva) della proteina (Cote R.J. et al., 1998).

Appare quindi chiaro da questa revisione della letteratura come la perdita della proteina RB sia importante nei tumori invasivi e possa occupare un posto non indifferente quale fattore prognostico. L'ipotesi che l'iperpressione possa altresì essere spia di malfunzionamento di pRB suggerisce la necessita' di riesaminare gli studi sinora prodotti alla luce di queste considerazioni per vedere se effettivamente il potere prognostico di questo marcatore risulti aumentato.

GENE PER LA PROTEINA P53

Definizione

E' un G.S.T. localizzato sul cromosoma 17, composto di 11 esoni (Rotter V. et al., 1991). Il gene codifica per una fosfoproteina di 53 Kda che agisce come fattore trascrizionale e partecipa a 2 processi del ciclo cellulare distinti ma interdipendenti: riparazione del DNA danneggiato ed apoptosi (Marx J. et al., 1993).

Funzione fisiologica

La proteina p53 normale (cosiddetta "wild type") giocherebbe un ruolo fondamentale nella salvaguardia della integrità genetica cellulare, promuovendo l'arresto del ciclo cellulare ogni qualvolta si verifichi un danno a livello del DNA, al fine di permettere l'intervento di enzimi riparatori del genoma, oppure innescando un processo di "suicidio" cellulare (apoptosi) qualora falliscano i tentativi di riparazione (Lane D.P., 1992; Miyashita T., 1994). Tale proteina sarebbe dotata di un potere oncosoppressivo poiché esperimenti in vitro hanno dimostrato che transfettando una copia del gene normale in cellule neoplastiche si ottiene l'inibizione della trasformazione (Finlay C.A., 1989).

A) Riparazione del DNA

Durante la fase G1 del ciclo cellulare, la proteina p53 si accumula nel citoplasma e migra nel nucleo all'inizio della fase S (Gannon J.V., 1991). Una volta legata al DNA, la p53 esplica il suo effetto inducendo la trascrizione di un altro gene regolatore detto CIP1/WAF1, il cui prodotto proteico (p21cip1), e' un inibitore universale delle cinasi ciclina-dipendenti (Cdk), proteine che normalmente stimolano la cellula nelle varie fasi del ciclo proliferativo (Marx J., 1993). Per questo motivo p21cip1 e' definita anche mediante la sigla CdkN1A (cyclin dependent Kinase inhibitor 1 A).

La proliferazione cellulare si compie attraverso una progressione ordinata di eventi che costituiscono il ciclo cellulare. Le varie fasi di quest'ultimo sono controllate da complessi proteici costituiti da una ciclina ed una Cdk. La ciclina e' la molecola regolatrice, mentre la Cdk funziona da subunita' catalitica, fosforilando vari elementi, tra cui anche la

proteina Rb, necessaria per l'attivazione della sintesi del DNA. Sono note 6 classi di cicline (indicate solitamente con le lettere dalla A alla E) ed altrettante Cdk (numerate dalla 1 alla 6), che formano complessi implicati nella progressione della cellula attraverso le varie fasi del ciclo replicativo. Sembra che le cicline e le Cdk possano andare incontro a mutazione nella tumorigenesi e pertanto sono considerate dei proto-oncogeni. La p21cip1 e' solo un elemento del set di proteine che possono agire da regolatori negativi dei complessi ciclina -Cdk.

In sintesi, la p53 induce l'espressione di p21cip1, la quale a sua volta inibisce varie Cdk, ma in particolare la Cdk2, proteina che normalmente permette alla cellula di passare alla fase S del ciclo. Ne risulta quindi che la p53 blocca la cellula nella fase G1 fornendo cosi' il tempo necessario per la riparazione del DNA danneggiato (**figura 17**) (Alison M., 1997).

B) Cooperazione tra p53 e pRb

Inizialmente considerati come due geni indipendenti, i g.s.t. p53 e Rb, secondo gli studi piu' recenti, sembrano regolare in modo sinergico il ciclo cellulare. La **figura 18** illustra come la p53 sia infatti in grado di influenzare, grazie all'induzione di p21cip1, l'attivita' delle Cdk tra le cui azioni si annoverano anche la fosforilazione di pRb. Elevati livelli di p21cip1 inibiscono il complesso ciclina-Cdk2, mantenendo cosi' pRb nello stato non fosforilato. In tal modo pRb si lega saldamente al fattore trascrizionale E2F che non e' cosi' in grado di attivare la trascrizione di geni necessari alla progressione del ciclo cellulare (William B.O., 1994).

C) Induzione dell'apoptosi

I meccanismi molecolari attraverso cui la p53 attiva l'apoptosi cellulare verranno discussi nel capitolo 19 al quale si rimanda.

Inattivazione della p53 nel cancro

Nei tumori umani sono stati descritte diverse vie di inattivazione della funzione oncosoppressiva della p53.

1. *Delezione genica*, ben documentata dal riscontro frequente di perdita dell'eterozigosi sul relativo locus genico.

2. *Mutazione genica*, che di solito comporta la produzione di una proteina non funzionante e con emivita allungata
3. *Inattivazione virale*: alcune oncoproteine virali quali ad esempio quelle di alcuni papilloma virus, possono complessarsi alla proteina p53 inattivandola (Pasquette R.L., 1993).
4. *Inattivazione da parte di altri oncogeni*. La proteina dell'oncogene MDM2, frequentemente iperespressa in alcuni tumori, e' in grado di inattivare la p53 normale mediante la formazione di un complesso non funzionante (Fakharadeh, 1991). Peraltro la p53 avrebbe la proprieta' di attivare la trascrizione di MDM2 che funzionerebbe quindi con un meccanismo di feedback negativo (Wu, 1993).

Le incertezze interpretative derivanti dagli studi sulla p53 nei TCC

Studi molecolari

Nei carcinomi vescicali è stata riportata con una certa frequenza la perdita di un allele del cromosoma 17p nel locus del gene p53 (Presti J.C., 1991; Olumi A.F., 1990). La frequenza di tale riscontro si correla significativamente con il grado e lo stadio patologici, raggiungendo una proporzione del 50% nei tumori di grado III. Viceversa, delezioni dell'altro allele (17q) risultano alquanto infrequenti (Dalbagni G., 1993).

La delezione allelica del cromosoma 17p è associata spesso a mutazioni a carico dell'allele controlaterale, con una frequenza del 90% secondo Sidransky (1991). In tal modo la funzione di "guardiano del genoma" espletata dalla p53 viene completamente inattivata. E' probabile che in presenza di una maggiore sensibilità delle tecniche di biologia molecolare, si potrebbe rinvenire una concordanza pressoché assoluta tra delezione allelica e corrispondente mutazione dell'allele controlaterale (Uchida T., 1995). E' stato però ipotizzato che le forme mutate di p53 siano in grado di funzionare anche come veri e propri oncogeni, in grado cioè di inibire la funzione della proteina normale complessandosi con essa. In pratica anche la sola mutazione in uno dei due alleli porterebbe alla inattivazione completa della funzione oncosoppressiva della p53 (Finlay C.A., 1988). Esiste una chiara associazione tra mutazioni di p53 con il grado e lo stadio tumorale. Per esempio, Fujimoto (1992) ha riscontrato mutazioni in 6 su 12 tumori invasivi ma solo in 1 su 13 tumori superficiali.

Studi immunohistochimici

La proteina p53 normale ha un'emivita plasmatica breve, variabile da 6 a 20 minuti. Il gene p53 mutato codifica invece per una proteina alterata, che forma un complesso stabile con un'altra proteina plasmatica, avente un'emivita da 4 a 20 volte più lunga (Finlay C.A., 1988).

Su questo principio si basa la determinazione immunohistochimica della p53, che risulterebbe positiva solo quando è presente un accumulo nucleo-citoplasmatico della proteina stessa quale si verifica in presenza della forma mutata, a lunga emivita (**Fotografia 2 A e B**). Anticorpi monoclonali specifici per la proteina p53 "wild-type", se fatti reagire su preparati istologici risultati marcatamente positivi con anticorpi specifici per la p53 alterata, non hanno dato luogo ad alcuna reazione positiva (Dalbagni G., 1993). Questa osservazione, unitamente al riscontro, da parte di più autori, di un'assoluta negatività immunohistochimica per la p53 in mucosa vescicale normale (Sarkis A.S., 1993; Serth J., 1995; Popov Z., 1994), dimostrerebbe come la corta emivita di una p53 normale precluda la possibilità di una sua determinazione con l'indagine immunohistochimica. Di tutt'altra opinione sono Underwood e coll., che hanno riscontrato una cospicua marcatura nucleare per la p53 in cellule uroteliali normali (Underwood M.A., 1996). Manca pertanto una interpretazione univoca sulla possibilità che anche la p53 normale possa essere rivelata utilizzando i comuni anticorpi anti-p53 utilizzati, dotati di specificità sia per la proteina mutata che per quella normale.

La concordanza tra il riscontro immunohistochimico e le alterazioni molecolari

Quale valore percentuale di positività immunohistochimica per la p53 può essere assunto come altamente predittivo di una corrispondente mutazione genetica? Oyasu e coll. (1995) recentemente hanno riportato una concordanza pressochè assoluta tra una positività superiore al 50% e mutazione genetica, mentre una mutazione genica sarebbe dimostrabile solo in 2 pazienti su 3 per valori di p53 compresi tra 5% e 50%. Dalbagni (1993) ha riscontrato una concordanza dell'80% tra iperespressione immunohistochimica della p53 e delezione dell'allele 17p, alterazione quest'ultima rilevata anche nel 27% di tumori con istologia negativa per la p53.

Questi dati sono sufficienti per dimostrare come la correlazione tra iperespressione della proteina p53 e la corrispettiva inattivazione genica sia tutt'altro che assoluta. Alcune

ipotesi vengono chiamate in causa a spiegazione del fatto che l'immunoistochimica potrebbe sovrastimare la presenza di mutazioni genetiche. Abbiamo già accennato al gene MDM2. La proteina da esso codificata sarebbe in grado di formare complessi stabili con la proteina p53 normale, con il risultato di inattivarla (Oliner J.D., 1992). La proteina p53 normale può altresì essere stabilizzata dall'azione di alcuni prodotti di geni virali, quali l'antigene T del virus SV40 (Lane D.P., 1979).

Al contrario, alterazioni del gene p53 potrebbero passare inosservate all'indagine immunoistochimica quando si tratti di mutazioni non senso, oppure per l'incapacità degli anticorpi disponibili a riconoscere tutti i possibili epitopi mutati (Oyasu R., 1995). Ovviamente problemi tecnici quali il danneggiamento di epitopi secondario ad un'impropria preparazione dei tessuti sono un'altra possibile fonte di reazioni falsamente negative (Battifora H., 1994). A tutto ciò si aggiunga l'impiego di diversi "kits" anticorpali nei vari studi riportati, tali da impedire un confronto dei risultati a motivo della possibile diversa sensibilità degli stessi. Per analizzare 28 TCC vescicali di stadio T1, Gardiner e coll. (1994) hanno impiegato i due anticorpi più utilizzati in letteratura (il Pab1801 ed il D07), riscontrando percentuali di positività sovrapponibili in tutti i casi.

A riprova di quanto poco chiara sia l'equivalenza tra immunoreattività e mutazione, il valore soglia di p53% utilizzato per definire un tumore come p53 positivo è largamente variabile in letteratura (**Tabella 10**). Sebbene quasi tutti gli autori concordino nel non attribuire alcun significato ad un valore di immunoreattività lieve (cioè inferiore al 5%), rimane comunque il problema su come interpretare una positività focale (riscontro non infrequente) in una neoplasia che per il resto risulti completamente negativa. Si tratta di un iniziale clone cellulare che esprime una p53 mutata, oppure queste cellule neoplastiche sono coinvolte in una fisiologica iperespressione di p53 normale quale estremo tentativo di difesa antitumorale (Battifora H., 1994)?

Prendendo in considerazione TCC vescicali di basso stadio e grado (TaGI), abbiamo recentemente dimostrato come l'iperespressione della p53 possa essere considerata fattore prognostico indipendente di progressione e di recidiva neoplastica quando si consideri un valore soglia di positività > dello 0% (Casetta et al., 1997). Ciò avvalorerebbe l'ipotesi sul possibile ruolo svolto nella tumorigenesi da parte di iniziali e sporadiche mutazioni del gene p53 in seno ad alcune cellule della neoplasia.

Le incertezze interpretative che sottendono l'immunoreattività della p53 giustificano in parte l'assoluta arbitrarietà nella scelta di un valore di cut-off per definire la soglia di positività, rendendo però difficile un confronto dei risultati tra i vari autori.

Correlazione con il grado e lo stadio tumorali

Nei TCC vescicali, mutazioni del gene p53 sono rare negli stadi superficiali (Ta e T1), mentre diventano alquanto frequenti nelle forme invasive (Sidransky D., 1991; Uchida T., 1995; Vet J.A.M., 1994; Yoshimura I., 1995). Allo stesso modo pressochè unanime è il riscontro di un trend crescente di espressione immunoistochimica della proteina p53 con il progredire di stadio e grado, indipendentemente dal valore soglia utilizzato per definirne la positività. La significatività statistica di queste differenze non è invece confermata da tutti gli autori come si può osservare nella **tabella 11**.

L'estrema variabilità dei risultati riportati nella tabella rende indispensabile una standardizzazione sia della metodica di laboratorio che dell'interpretazione della soglia di positività per la p53 prima di produrre ulteriori studi in futuro.

Valore prognostico dell'immunoreattività per la proteina p53 nei TCC vescicali

La constatazione che le mutazioni del gene p53 sono alquanto infrequenti in tumori transizionali di basso grado e stadio, per aumentare poi con la progressione istologica, ha indotto molti autori ad attribuire alla p53 un ruolo chiave nella progressione del carcinoma vescicale. (Schmitz-Drager B.J., 1994; Esrig D., 1994).

Valore prognostico della p53 nei TCC vescicali di stadio Ta

In una casistica di 59 pazienti di stadio TaGI, Casetta et al. (1997) hanno rinvenuto una proporzione pressochè sovrapponibile di casi p53 positivi (valore soglia del 5%) sia nel gruppo di pazienti andati incontro a recidiva (p53+ = 7,1%) che in quelli non recidivati (p53+ = 6,5%). Neppure è stato possibile rinvenire alcuna correlazione tra espressione della p53 e progressione di stadio (da Ta a T1). Altri autori hanno invece constatato l'assenza di immunoreattività per la p53 nei TaGI papilliferi, e solo una debole positività per le forme superficiali moderatamente differenziate (Schmitz-Drager B.J., 1994).

Valore prognostico della p53 nei TCC di stadio T1

Come illustrato nella **tabella 12**, parte degli autori è concorde circa l'utilità della p53 immunoistochimica quale indice predittivo di progressione o di ridotta sopravvivenza nei

carcinomi di stadio T1 (Sarkis A.S., 1993; Serth J., 1995; Esrig D., 1994; Thomas D.J., 1994; Hermann G.G., 1998). Al contrario, i dati prodotti da Vatne (1995), pur evidenziando un' elevata prevalenza di p53 anomala nei T1, non sono indicativi di un aumentato rischio di progressione nei casi con p53 positiva. Allo stesso modo Gardiner (1994) concorda nel ritenere lo status della p53 nei tumori in stadio T1 come un dato del tutto indifferente riguardo la prognosi. Thomas e coll. (1994), pur riportando una significativa incidenza di progressione nei T1 con p53 positiva rispetto a quelli p53 negativi, fanno notare come il grado istologico rimanga il più significativo indice predittivo di progressione. In realtà nelle casistiche prodotte da questi autori l'analisi è stata condotta raggruppando istotipi tumorali a diverso andamento prognostico quali per l'appunto i tumori in stadio T1GII e T1GIII (Heney N.M., 1982; Jakse G., 1987; Jenkins B.J., 1989). Lipponen (1993) dal canto suo attribuisce la mancanza di un significato prognostico della p53 nei TCC superficiali (Ta e T1) al fatto che la p53 diviene espressa significativamente solo negli stadi più avanzati del carcinoma vescicale. In realtà anche in quest'ultimo caso l'analisi viene condotta su una miscellanea di istotipi TaGII e TaGIII. Al contrario Serth (1995) attribuisce un importante valore predittivo di progressione alla p53 quando si prendano in considerazione solo istotipi Ta-T1 e GI-GII, tralasciando quindi i TCC di grado III. Infine Esrig (1994), valutando l'andamento clinico di pazienti prevalentemente in stadio T1GIII sottoposti a cistectomia radicale, attribuisce un peso significativo alla p53 nel condizionare la sopravvivenza e la recidiva a 5 anni.

Piu' recentemente Raitanen M. (1997) e Burkard R. (1997) non hanno rinvenuto alcuna utilita' della p53 quale marcatore di progressione nei TCC vescicali superficiali, contrariamente ad Hermann G.G. (1998) secondo il quale la positivita' per la p53 costituirebbe, assieme al livello di invasione della lamina propria (T1a, T1b, T1c), un elemento di prognosi sfavorevole per la sopravvivenza.

Valore prognostico della p53 nel CIS

Nonostante la terapia con BCG riduca significativamente il rischio di sviluppo di un TCC invasivo (Pagano F., 1994), pur tuttavia un terzo dei pazienti portatori di CIS vescicale rimane a rischio di progressione. Pertanto l'identificazione di marcatori biologici predittivi di progressione diventa quanto mai importante per questa entità istologica. Uno studio di Sarkis e coll. (Sarkis A.S., 1994) (l'unica casistica rilevante attualmente

comparsa in letteratura), attribuisce al rinvenimento di una positività per la p53 un'elevata probabilità di progressione neoplastica (pari all'86,7%) rispetto alla situazione di p53 negativa dove il rischio di progressione è del 16,7%. Sulla base dell'analisi multivariata, l'iperpressione nucleare della p53 risulta essere l'unico marcatore indipendente di progressione e l'unica variabile associata in modo significativo all'evento morte per TCC vescicale.

Valore prognostico della p53 nel carcinoma vescicale infiltrante

L'incidenza di recidiva neoplastica a 5 anni dalla cistectomia in TCC vescicali di stadio pT2 e pT3 è secondo Esrig D. e coll. (1994) rispettivamente del 12% ed 11% nei casi p53 negativi e del 56% ed 80% nei casi positivi (**Tabella 13**). Questi dati, se confermati, potrebbero influenzare la selezione dei pazienti da sottoporre ad un eventuale trattamento adiuvante. Anche Lipponen P.K. (1993) riconosce alla p53 un valore predittivo di sopravvivenza statisticamente significativo nei TCC infiltranti. A conclusioni del tutto opposte perviene Underwood M.A. (1996), prendendo però in considerazione una casistica alquanto esigua (23 pazienti) di TCC vescicali infiltranti. In uno studio recente su 39 soggetti sottoposti a cistectomia radicale, l'espressione di p53 è stata correlata significativamente alla sopravvivenza (Tsuji M., 1997). Considerando però che la casistica comprende anche TCC vescicali in stadio T1G2 e che non è stata presa in considerazione la variabile stadio nell'indagine statistica, questi dati risultano poco probanti.

Correlazione della p53 con altri markers prognostici

Introduzione

L'idea che la determinazione di un pattern di alterazioni qualitative o quantitative nel genoma tumorale potesse risultare di utilità clinica nel classificare tumori a parità di grado e stadio in differenti categorie prognostiche, ha guidato la realizzazione di studi immunocistochimici mirati ad indagare l'espressione sincrona di più proteine oncogeniche od oncosoppressive.

P53 e pRb

L'intimo legame che accomuna nel meccanismo d'azione le proteine p53 e pRb sembra confermarsi dall'effetto cooperativo che le rispettive forme alterate di questi geni esplicano ai fini della prognosi.

Cordon Cardo e coll. (1997) riportano un marcato rischio di progressione (fino a 10 volte) per i tumori con alterazione sincrona di entrambi i marcatori rispetto alle neoplasie in cui una sola delle due proteine è mutata. A conferma di questi dati, il recente studio di Cote et al. (1998) evidenzia un maggiore rischio di recidiva ed una ridotta sopravvivenza nei TCC con alterata espressione di entrambi i G.S.T.

P53 ed MDM2

L'oncogene MDM2 codifica per una proteina nucleare di 90 Kda, in grado di inibire la funzione della proteina p53 attraverso la formazione di un complesso inattivo (Oliner et al., 1993). Come per la p53, non è stata evidenziata alcuna immunoreattività per MDM2 nell'urotelio normale (Schmitz-Drager B.J., 1997). La proteina MDM2 è iperespressa immunohistochemicalmente in circa il 30% dei tumori vescicali, ma in un solo caso su 56 è stata evidenziata un' amplificazione del gene. L'iperespressione sincrona dei due marcatori negli uroteliomi non sembra essere di riscontro frequente (Barbareschi, 1995). Per giunta l'immunoreattività di MDM2 si correla maggiormente con i tumori di basso grado (Lianes et al., 1994; Schmitz-Drager B.J., 1997). La positività immunohistochemical per MDM2 da sola pare essere priva di significato prognostico, mentre alterazioni a carico di entrambi i geni si associano ad un rischio di progressione molto elevato (Schmitz-Drager B.J., 1997).

Questi studi indicano come MDM2 potrebbe possedere un potere oncogeno che è p53 indipendente, sebbene l'inattivazione genica di entrambi possa avere un effetto sinergico dal punto di vista prognostico.

P53 e p21

Abbiamo precedentemente spiegato come la p53 sia in grado di arrestare il ciclo cellulare in risposta ad un danno al DNA, attraverso l'induzione della proteina p21cip1 (WAF1/CIP1), un potente inibitore delle proteine Cdk. Mutazioni del gene WAF1/CIP1 sono alquanto infrequenti nei tumori umani in generale (Shiohara M. et al., 1994) come pure nei TCC (Malkowicz et al., 1996). Al contrario, l'espressione di p21 è di comune

riscontro nei tumori umani e si correla con un' aumentata quantità del relativo mRNA (Marchetti et al., 1996; Malkowicz et al., 1996). L' immunoreattività per la p21 si correla inversamente con il grado e lo stadio tumorali nei TCC, mentre è assente nell' urotelio normale (Quareschi K.N. et al., 1998; Clasen S., 1998). La prevalente espressione nei tumori di basso grado e stadio potrebbe riflettere un residuo controllo inibitorio sulla proliferazione ancora attivo in questi tumori. Braithwaite (1997) ha notato una correlazione significativa tra espressione di p21 e sopravvivenza nei TCC vescicali. Al contrario, nessuna associazione è stata dimostrata tra espressione di p21 ed immunonegatività per la p53, ad indicare che la p21 potrebbe essere indotta attraverso meccanismi molecolari alternativi alla p53 (Closen et al., 1998).

P53 e recettori per i fattori di crescita

Wright (1990 e 1991) non ha rinvenuto alcuna associazione significativa tra espressione della proteina p53 ed EGFr, mentre ha osservato una debole correlazione tra l' iperespressione della p53 e del c-erbB-2. Di parere opposto è Lipponen (1994), che riporta una significativa correlazione tra iperespressione della p53 ed EGFr.

P53 e ploidia tumorale

Dal momento che la p53 presiede alla riparazione del DNA danneggiato, è ragionevole aspettarsi che i tumori con p53 mutata possano avere un contenuto anomalo di DNA, cioè un' alterata ploidia cellulare (vedi capitolo 14).

Ed infatti un' intima correlazione tra ploidia nucleare ed espressione per la p53 è stata riportata da più autori (Lipponen P.K., 1993; Nakopoulou L., 1995). Pur tuttavia un numero significativo di tumori non-diploidi non presenta alterazioni della p53 (Mellon K., 1994). Tumori vescicali recidivanti in forma superficiale sono soprattutto diploidi e p53 negativi (Raitanen M-P., 1997). La presenza simultanea di popolazioni aneuploidi ed iperespressione della p53 in TCC vescicali invasivi è altamente predittiva sulla mortalità dei pazienti, con una sopravvivenza del 29% a 5 anni. Al contrario, la sopravvivenza a 5 anni si colloca attorno all' 83% in TCC invasivi che presentino simultaneamente un genoma diploide ed una p53 negativa (Nakopoulou L., 1995).

P53 e marcatori di proliferazione cellulare

Il gene soppressore di tumore p53 è intimamente coinvolto nella regolazione della differenziazione cellulare, nella morte cellulare e nel controllo della proliferazione. Non

stupisce pertanto che l'indice proliferativo determinato mediante il Ki67 (un anticorpo specifico per un antigene espresso in tutte le fasi del ciclo cellulare) risulti elevato in modo significativo nei tumori con p53 positiva rispetto a quelli p53 negativi (Moch H., 1994). Secondo Tsuji e coll. (1997) su 31 soggetti sottoposti a cistectomia radicale, non vi è stato alcun caso di morte in 32 mesi di follow-up medio tra coloro che presentavano valori di Ki67 < del 32% e p53 negativa.

P53 e terapie mediche nei TCC vescicali

Alcuni lavori recenti hanno sollevato il problema della possibile “immunoresistenza” al trattamento con BCG nei tumori p53 positivi. Hudson M.A. (1995) riferisce come la progressione dei TCC vescicali superficiali trattati con BCG passi dal 22% nei casi p53 negativi al 75% in quelli p53 positivi. Caliskan M et al. (1997) hanno riportato una progressione istologica in 5 su 6 tumori p53 positivi sottoposti a cicli di BCG contro 6 su 24 che erano p53 negativi.

Gli entusiasmi verso una terapia aggressiva, ivi compresa la cistectomia, da riservarsi ai tumori superficiali con espressione immunoistochimica di p53, vengono però mitigati dalla constatazione che i carcinomi in situ hanno una percentuale di risposta al BCG del 60% anche quando p53 positivi (Ick K., 1997) e che il 73% di 26 pazienti p53 positivi prima del trattamento sono risultati p53 negativi dopo BCG (Ovesen H., 1997).

Da studi in vitro su tumori ematologici e della mammella, le mutazioni del gene p53 sono apparse essere legate alla chemioresistenza (Lowe S.W., 1997). Il rationale di questa constatazione potrebbe risiedere nel fatto che le cellule con p53 alterata sono meno suscettibili di andare incontro ad apoptosi. Sorprendentemente, 2 autorevoli studi recenti (Waldman T., 1996; Cote R.J., 1997) hanno invece dimostrato che per quanto riguarda i tumori vescicali le alterazioni della p53 si associano ad un'aumentata sensibilità alla chemioterapia con sostanze genotossiche, con conseguente miglioramento della sopravvivenza.

Similmente, linee cellulari di tumore vescicale che esprimono p53 mutata sono più radiosensibili rispetto a quelle con p53 di tipo “wild type”. Questo fatto potrebbe essere spiegato dalla minore capacità di riparare il DNA danneggiato (Ribeiro J.C., 1997).

Significato clinico della p53

Dopo anni di studi finalizzati ad indagare il ruolo prognostico dell'espressione della p53 nei TCC vescicali, non è ancora possibile a tutt'oggi attribuire a questo marcatore un ruolo preciso nella pratica clinica. L'arbitrarietà nella definizione di una soglia di positività, la variabilità delle metodiche immunoistochimiche, dettata soprattutto dall'utilizzo di diverse preparazioni anticorpali, renderebbero necessaria anche per la p53 una sorta di "Consensus Review" mirata alla definizione di comuni linee guida di studio. In particolare è imperativo chiarire se si intenda assumere quale valore soglia di p53 quello più probabilisticamente corrispondente ad un'alterazione genomica, oppure un valore arbitrario che corrisponda alla massima utilità prognostica sulla base di calcoli puramente statistici. Nel primo caso è ovvio che saranno necessari ulteriori studi condotti simultaneamente a livello immunoistochimico e molecolare, utilizzando casistiche ben più ampie di quelle apparse sinora in letteratura.

Dopo questo breve excursus sulla p53 nel TCC vescicale, lastricato a tratti da facili entusiasmi e parziali smentite, possono tuttavia delinearsi alcuni punti fermi, che attendono eventualmente una conferma da ulteriori studi:

1. L'espressione immunoistochimica per la p53 appare poco rilevante e priva di significato prognostico nei TCC superficiali di basso stadio e grado.
2. Nei tumori in stadio T1 emerge un chiaro ruolo predittivo sulla progressione da parte di una positiva immunoreattività della p53 quando le forme di grado elevato (GIII) vengano considerate a parte dalle forme di grado intermedio (GII). Sono però necessarie ulteriori conferme su casistiche che valutino separatamente queste due categorie prognostiche.
3. Le poche casistiche che prendono in considerazione i tumori vescicali infiltranti concordano sull'utilità prognostica della p53 per quel che riguarda la sopravvivenza. L'uso routinario della p53 potrebbe in questi casi agevolare la selezione di potenziali candidati ad un trattamento neoadiuvante e/o adiuvante. Nella nostra ricerca non abbiamo rinvenuto studi che indaghino il valore predittivo della p53 sulla presenza di metastasi linfonodali; l'incremento della accuratezza della stadiazione preoperatoria consentirebbe infatti un più razionale utilizzo delle strategie terapeutiche.

4. L'utilizzo combinato della immunoreattività alla p53 con quella per il Rb da una parte e con la ploidia dall'altra rappresentano al momento attuale le uniche associazioni di markers tumorali dotata di maggiore utilità prognostica rispetto alla determinazione isolata della p53.

I GENI CDK2 ED INK4B

Definizione

Il gene CDKN2 (detto anche INK4B) e' stato mappato sul cromosoma 9. Come vedremo nel capitolo 11, la perdita del cromosoma 9 e' un evento molto frequente e sembra verificarsi precocemente nella tumorigenesi. La delezione parziale o completa di detto cromosoma ha fatto sorgere l'ipotesi che potesse essere la sede di uno o piu' G.S.T.

Il mappaggio del cromosoma 9 ha permesso di identificare una zona dove risiedono i geni CDKN2, che codifica per la proteina **p16** ed INK4B che viene tradotta in una proteina di 15Kda (**p15**) (Knowles M.A., 1998).

Funzione fisiologica

La p16 e la p15 appartengono alla classe delle proteine che agiscono come regolatori negativi dei complessi ciclina-Cdk e sono pertanto classificate tra gli inibitori delle Cdk (CdkI). Queste proteine in particolare inibiscono le Cdk4, con conseguente blocco della progressione del ciclo cellulare (Alison M., 1997).

Inattivazione nel cancro

Si e' visto che CDKN2 e' spesso deleta o mutata in diversi istotipi tumorali (Kaub et al., 1994) e pare intimamente coinvolto nello sviluppo di melanomi ad andamento familiare (Hussussian et al., 1994). La regione cromosomica che comprende entrambi i geni CDKN2 ed INK4B e' un sito frequente di delezione nei tumori come dimostrato per mezzo di tecniche citogenetiche (Orlow et al., 1995).

Valore prognostico di CDKN2 e di INK4B nei TCC

Una larga proporzione di TCC vescicali mostra delezione omozigote dei loci genici CDKN2 e INK4B, mentre e' rara la delezione selettiva di INK4B (Williamson et al., 1995; Orlow I., 1995). Il riscontro di mutazioni a carico di questi geni e' invece alquanto infrequente (Gruis et al., 1994). La maggior parte degli studi non ha pero' dimostrato alcuna correlazione tra delezione genica ed il grado/stadio della malattia (Knowles M.A., 1998). La delezione del gene CDKN2 e' un evento alquanto frequente e si verifica negli stadi precoci della tumorigenesi dell'epitelio transizionale (Balazs et al., 1997).

BIBLIOGRAFIA

Alison M. R., Sarraf C. E. Understanding cancer. Cambridge University Press. 1997.

Barbareschi M. et al. Expression of mdm-2 and p53 protein in transitional cell carcinoma. Urology Res 1995; 22 (6): 349-352.

Battifora H.: P53 immunohistochemistry: a word of caution. Human Pathol. 25-5: 435-437, 1994.

Braithwaite K.L. et al. WAF1 expression in transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder: inverse relationship to p53 accumulation and association with good prognosis. Proceedings of the American Association for Cancer Research, 1997. Abstract n. 3524.

Burkhard F.C. et al. Immunohistochemical determination of p53 overexpression. An easy and readily available method to identify progression in superficial bladder cancer? Urol Res 1997; 25 (suppl 1): S31-S35.

Cairns P., Proctor A.J. and Knowles M.A. Loss of heterozigosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. Oncogene 1991; 6: 2305-2309.

Calisan M. et al. Nuclear accumulation of mutant p53 protein: a possible predictor of failure of intravesical therapy in bladder cancer. *Br J Urol* 1997; 79: 373-377.

Casetta G., Gontero P., Russo R., Pacchioni D., A. Tizzani. P53 expression compared with other prognostic factors in OMS grade –I stage-Ta transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 1997; 32: 229-236.

Closen S. et al. Frequent and heterogenous expression of cycli-dependent kinase inhibitor WAK1/p21 protein and mRNA in urothelial carcinoma. *Br J Cancer* 1998; 77(4): 515-521.

Cordon Cardo C. et al. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cncer Inst* 1992; 84: 1251-1256.

Cordon Cardo C. et al. Cooperative effects of the p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumours. *Cancer Res* 1997; 57: 1217-1221.

Cote J.R. et al. p53 and treatment of bladder cancer. *Nature* 1997; 385: 123-124.

Cote J.R. et al. Elevated and absent pRB expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. *Cancer Res* 1998; 58: 1090-1094.

Dalbagni G., Presti Jr J.C., Reuter V.E., Zhang Z.F., Sarkis A.S., Fair W.R., Cordon Cardo C.: Molecular genetic alterations of chromosome 17 and p53 nuclear overexpression in human bladder cancer. *Diagn. Mol. Pathol.* 2: 4, 1993.

Esrig D., Elmajian D., Groshen S., Freeman J.A., Stein J.P., Chen S., Nichols P.W., Skinner D.G., Jones P.A., Cote R.J.: Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *New Engl. J. Med.* 10: 1259-1264, 1994.

Fakharadeh S.S., Trusko S.P., George D.L. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO* 1991; 10: 1565-1569.

Finlay C.A., Hinds P.W., Tan T.H. et al.: Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc 70 complex with an altered half-life. *Mol. Cell Biol.* 8: 531-539, 1988.

Finlay C.A., Hinds P.W., Lewine A.J.: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083, 1989.

Fujimoto K., Yamada Y., Okajima E., Kakiroe T., Sasaki H., Sugimura T.: Frequent association of p53 gene mutations in invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 52: 1393-1398, 1992.

Gannon J.V. , Lane D.P. Protein synthesis required to anchor a mutant p53 protein which is temperature sensitive for nuclear transport. *Nature* 1991; 349: 802-806.

Gardiner R.A., Walsh M.D., Allen V. et al.: Immunohistological expression of p53 in primary T1 transitional cell bladder cancer in relation to tumor progression. *Br. J. Urol.* 73: 526-532, 1994.

Gruis N.A. et al. Genetic evidence in melanoma and bladder cancers that p16 and p53 function in separate pathways of tumor suppression. *Am J Path* 1995; 146: 1199-1206.

Heney N.M., Nocks B.N., Daly J.J. et al.: Ta and T1 bladder cancer: location, recurrence and progression. *Br. J. Urol.* 54: 152-157, 1982.

Herman G.G., Horn T. and Steven K. The influence of the level of lamina propria invasion and the prevalence of p53 nuclear accumulation on survival in stage T1 transitional cell bladder cancer. *J Urol* 1998; 159: 91-94.

Hudson M.A. et al. P53 protein accumulation in superficial bladder cancer: a predictor of tumor progression which is not affected by intravesical BCG therapy. *J Urol* 1995; 153: 361A.

Hussussian C.J. et al. Germline mutations in familial melanoma. *Nat Gen* 1994; 8: 15-21.

Ick K. et al. Significance of p53 overexpression in urinary bladder transitional cell carcinoma in situ before and after Bacillus Calmette-Guerin treatment. *Urology* 1997; 49: 541-547.

Jakse G., Loidl W., Seeber G., Hofstadter F.: Stage T1, grade 3 transitional cell carcinoma of the bladder: an unfavorable tumor? *J. Urol.* 137: 39-43, 1987.

Jenkins B.J., Nauth-Misir R.R., Martin J.E., Fowler C.G., Hopestone H.F., Blandy J.P.: The fate of G3pT1 bladder cancer. *Br. J. Urol.* 64: 608-610, 1989.

Kamb A., Gruis N.A., Weaver-Feldhaus J. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-440.

Knowles M.A. Molecular genetics of bladder cancer: pathways of development and progression. In *Cancer surveys vol. 31. Bladder cancer.* Oliver R.T.D. and Coptcoat M.J. Editors. CSHL Press, 1998.

Lane D.P. and Crawford L.V.: T antigen is bound to a host protein in SV 40 transformed cells. *Nature* 278: 261, 1979.

Lane D.P. P53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 351: 1644-1645.

Lianes P. et al. Altered patterns of MDM2 and p53 expression in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1325-1330.

Lipponen P.K.: Overexpression of p53 nuclear oncoprotein in transitional cell bladder cancer and its prognostic value. *Int. J. Cancer* 53: 365-370, 1993.

Lipponen P., Eskelinen M.: Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long term prognosis. *Br. J. Cancer* 69: 1120-1125, 1994.

Lipponen P.K., Liukkonen T.J. Reduced expression of retinoblastoma (RB) gene protein is related to cell proliferation and prognosis in transitional cell bladder cancer. *J. Cancer Res Onc* 1995; 121 (1): 44-50.

Logothetis C.J. et al. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1256-1261.

Lowe S.W. e Jacks T. Risposta a Cote et al. *Nature* 1997; 385: 124-125.

Malkowicz S.B. et al. Novel p21 cip1/WAF1 mutations in superficial and invasive transitional cell carcinomas. *Oncogene* 1996; 13: 1831-1837.

Marchetti A. et al. p21 RNA and protein expression and association with tumoral differentiation. *Oncogene* 1996; 12: 1319-1324.

Marx J. How p53 suppresses cell growth. *Science* 1993; 162: 1644-1645.

Mellon K. et al. Abnormalities in p53 and DNA content in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 1994; 73: 522-525.

Miyamoto H. et al. Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer. *Br J Cancer* 1995; 71: 831-836.

Miyamoto H. et al. Loss of heterozygosity at the p53, RB, DCC and APC tumor suppressor gene loci in human bladder cancer. *J Urol* 1996; 155: 1444-1447.

Miyashita T., Krajewski S., Krajewska M., Wang H.G., Lin H.K., Liebermann D.A., Hoffman B., Reed J.C.: Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9: 1799-1805, 1994.

Moch H., Sauter G., Mihatsch M.J., Gudat F., Epper R., Waldman F.M.: P53 but not erbB-2 expression is associated with rapid tumor proliferation in urinary bladder cancer. *Hum. Pathol.* 25, 12: 1346-1351, 1994.

Nakopoulou L., Constantinides C., Papandropoulos J., Theodoropoulos G., Tronou A., Giannopoulos A., Zervas A., Dimopoulos C.: Evaluation of overexpression of p53 tumor suppressor protein in superficial and invasive transitional cell bladder cancer: comparison with DNA ploidy. *Urology* 3: 46, 1995.

Oliner J.D., Kinzler K.W., Meltzer P.S., George D.L., Vogelstein B.: Amplification of a gene encoding a p53 associated protein in human sarcomas. *Nature* 358: 80, 1992.

Oliner J.D. et al. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumor suppressor p53. *Nature* 1993; 362: 857-860.

Olumi A.F., Tsai Y.C., Michols P.W., Skinner D.G., Cain D.R., Bender L.I., Jones P.A.: Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade TCC of bladder. *Cancer Res.* 50: 7081, 1990.

Orlow I. Et al. Deletion of the p16 and p15 genes in human bladder tumours. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1524-1529.

Ovesen H, Horn T, Steven K. Long-term efficacy of intravesical Bacillus Calmette-Guerin for carcinoma in situ: relationship of progression to histological response and p53 nuclear accumulation. *J Urol* 1997; 157: 1655-1659.

Oyasu R., Non L., Szumel R.C., Kawamata H., Hirohashi S.: P53 gene mutations in human urotelial carcinomas: analysis by immunohistochemistry and single-strand conformation polymorphism. *Modern Pathol.* 8, 2: 170-176, 1995.

Pagano F., Bassi P.: BCG immunotherapy in superficial bladder cancer. Ed. CLEUP, Padova, 1994.

Pasquette R.L. et al. Mutations of p53 and human papillomavirus infection in carcinoma. *Cancer* 1993; 72: 1262-1280.

Popov Z., Colombel M., Mozerolles C., Ravery V., Patard J.J., Abbon C., Bellot J., Chopin D.: Evaluation of proliferation and p53 overexpression in bladder cancer. *J. Urol.* 151 (II): 443A, 1994.

Presti J.C., Reuter V.E., Galan T., Fair W.R., Cordon Cardo C.: Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res.* 51: 5405, 1991.

Qureschi K.N., Lunec J., Neal D.E. Molecular biological changes in bladder cancer. In: *Cancer Surveys* vol. 31. Bladder cancer. Oliver R.T.D. and Coptcoal M.J. Editors. CSHL Press, 1998.

Raitanen M-P. et al. P53 accumulation, deoxyribonucleic acid ploidy and progression of bladder cancer. *J Urol* 1997; 157: 1250-1253.

Ribeiro J.C. et al. Relationship between radiation response and p53 status in human bladder cancer cells. *Int J Radiat Biol* 1997; 72 (1): 11-20.

Rotter V., Prococimer M. P53 and human malignances. *Adv Cancer Res* 1991; 57: 257-270.

Sarkis A.S., Dalbagni G., Cordon Cardo C., Zhang Z.F., Sheinfeld J., Fair W.R., Herr H.W., Reuter V.E.: Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J. Nat. Cancer Ins.* 85, 1: 53-59, 1993.

Sarkis A.S., Dalbagni G., Cordon Cardo C., Melamed J., Zhang Z.F., Sheinfeld J., Fair W.R., Herr H.W., Reuter V.E. Association of p53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J. Urol.* 152: 388-392, 1994.

Schmitz-Drager B.J., van Roeyen C.R., Grimm M.O., Gerhare C.D., Decker K., Schulz W.A., Bulte H., Makzi D., Ebert T., Achermann R.: P53 accumulation in precursor lesions and early stages of bladder cancer. *World J. Urol.* 12(2): 79-83, 1994.

Schmitz-Drager B.J. et al. P53 and MDM2 in the development and progression of bladder cancer. *Eur Urol* 1997; 32 (4): 487-493.

Serth J., Kuczyk M.A., Bokemeyer C., Hervatin C., Nofe R., Tan H.K., Johnas U.: P53 immunohistochemistry as an independent prognostic factor for superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Br. J. Cancer* 71: 201-205, 1995.

Shiotara M. et al. Absence of WAF-1 mutations in a variety of human malignances. *Blood* 1994; 4: 3781-3784.

Sidransky D., Van Eschenbach A., Tsai Y.C., Jones P., Summerhays I., Marshal F., Paul M., Green P., Hamilton S.R., Frost P., Vogelstein B.: Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 252: 706, 1991.

Sparkes R.S. et al. Regional assignment of genes for human esterase D and retinoblastoma to chromosome band 13q14. *Science* 1980; 208: 1042-1044.

Tetu B. et al. Prevalence and clinical significance of her-2/neu, p53 and pRB expression in primary superficial bladder cancer. *J Urol* 1996; 155: 1784-1788.

Thomas D.J., Robinson M.C., Charlton R., Wilkinson S., Shenton B.K., Neal D.E.: P53 expression, ploidy and progression in pT1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Br. J. Urol.* 73: 533-537, 1994.

Tsuji M. et al. Prognostic value of Ki67 antigen and p53 protein in urinary bladder cancer: immunohistochemical analysis of radical cystectomy specimens. *Br J Urol* 1997; 79: 367-372.

Uchida T., Wada C., Ishida H., Wang C., Egawa S., Yokoyama E., Kameya T, Koshiba K.: P53 mutations and prognosis in bladder tumors. *J. Urol.* 153: 1097-1104, 1995.

Underwood M.A., Reeves J., Smith G., Gardiner D.S., Scott R., Bartlett J., Cooke T.G.: Overexpression of p53 protein and its significance for recurrent progressive bladder tumors. *Br. J. Urol.* 77: 659-666, 1996.

Vatne V., Maartmann-Moe H., Hoestmark J.: The prognostic value of p53 in superficially infiltrating transitional cell carcinoma. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 29: 491-495, 1995.

Vet J.A.M., Binguier P.P., Poddighe P.J., Karthans H.F.M., Debruyne F.M.J., Schalken J.A.: P53 mutations have no additional prognostic value over stage in bladder cancer. *Br. J. Cancer* 7: 496-500, 1994.

Xu H.J. et al. Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumour progression. *Int J Cancer* 1993; 53: 781-784.

Yoshimura I., Kudah J., Saito S., Taraki H., Shimizu N.: P53 gene mutations in recurrent superficial bladder cancer. *J. Urol.* 153: 1711-1715, 1995.

Waldman T. et al. p53 and treatment in human tumours. *Nature* 1996; 381: 713-716.

William B.O. et al. Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in pRb and p53. *Nat Genet* 1992; 7: 480-484.

Williamson M.P. et al. p16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. *Hum Mol Gen* 1995; 4: 1569-1577.

Wright C., Mellon K., Neal D.E., Johnson P., Corbett I.P., Horne C.H.W.: Expression of c-erbB-2 (neu) protein product in bladder cancer. *Br. J. Cancer* 64: 764, 1990.

Wright C., Mellon K., Johnston P., Lane D.P., Harris A.L., Horne C.H.W., Neal D.E.: Expression of mutant p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br. J. Cancer* 63: 967-970, 1995.

Wu X. et al. The p53-MDM2 autoregulatory feedback loop. *Genes Develop* 1993; 7: 1126-1132.

CAP. 11: APPROCCIO ALLO STUDIO DEI CROMOSOMI IN ONCOLOGIA

STRUTTURA DEI CROMOSOMI

I cromosomi sono delle strutture a forma di filamento ispessito costituiti da una miscela di DNA e proteine istoniche (detta **cromatina**), localizzati nel nucleo cellulare. Molto semplicemente, ogni cromosoma è costituito da un insieme di geni.

Un nucleo umano normale di una cellula somatica contiene in totale 46 cromosomi (22 paia di cosiddetti autosomi ed un singolo paio di cromosomi sessuali: XX nella donna ed XY nell'uomo) e viene definito diploide per distinguerlo da quello delle cellule gametiche (ovuli e spermatozoi) che contiene solo 23 cromosomi ed è pertanto detto aploide.

La struttura di un cromosoma è visualizzabile con la semplice microscopia ottica poiché

1. i cromosomi hanno una grandezza sufficiente ,
2. si colorano con particolari sostanze affini al DNA (da cui l'origine greca del nome chroma = colore e soma = corpo) e
3. in una particolare fase del ciclo cellulare (la metafase) si trovano in uno stato di massima contrazione, si sono duplicati passando dalla forma a bastoncino (detto **cromatide**) a quella di una lettera "X" (che contiene 2 cromatidi) e sono ben separati tra loro in modo che le differenze morfologiche risaltano all'occhio dell'osservatore.

I cromosomi non sono uniformi in larghezza lungo tutta la loro lunghezza, ma presentano una zona assottigliata chiamata **centromero**, un organulo dalla struttura non ben nota, che sembra essere responsabile del movimento dei cromosomi durante la divisione cellulare. Il centromero permette di identificare in un cromosoma un **braccio corto** ("p") ed un **braccio lungo** ("q"). L'estremità distale di ciascun braccio costituisce il **telomero**. Dal punto di vista morfologico i cromosomi possono essere classificati in base alla posizione del centromero. Se quest'ultimo si trova centralmente, il cromosoma è **metacentrico**; se il centromero è in posizione distale, il cromosoma viene detto **acrocentrico**, mentre quando la posizione è intermedia, il cromosoma è **submetacentrico (figura 19)**. I cromosomi acrocentrici possono avere delle appendici a forma di stelo, dette **satelliti**, che costituiscono il nucleolo delle cellule in fase di

quiescenza e contengono multiple copie ripetute di geni per l'RNA ribosomiale. Oltre che per la posizione del centromero, le 23 paia di cromosomi differiscono anche per la loro lunghezza totale, così da poter essere per la maggior parte identificate semplicemente per mezzo della microscopia ottica. L'avvento poi delle tecniche colorimetriche di "bandaggio" dei cromosomi (vedi oltre) ha permesso un riconoscimento oltremodo preciso dei singoli cromosomi come pure l'identificazione di sottili anomalie (Mueller R.F. e Young I.D., 1995).

I CROMOSOMI NELLE VARIE FASI DEL CICLO MITOTICO

Poco prima che la cellula inizi la fase mitotica (**interfase**), ciascun cromosoma è costituito da 2 cromatidi identici, quale risultato della replicazione del DNA avvenuta durante la fase S del ciclo cellulare. La cromatina nucleare appare però come una matassa informe, per cui i cromosomi non sono identificabili nella loro struttura. La mitosi è il processo per mezzo del quale ciascun paio di cromatidi si separa a costituire i nuclei di 2 cellule figlie. Nella **profase**, i cromosomi si condensano, la membrana nucleare si disintegra ed appaiono i centrioli ai due poli della cellula. Nella **metafase** i cromosomi si orientano lungo il piano equatoriale della cellula, agganciandosi ai centrioli per mezzo di microtubuli al fine di formare il fuso mitotico (**figura 19**). È in questa fase che i cromosomi sono più facilmente visibili perché massimamente contratti e perché hanno assunto la forma di "X" grazie al fatto che i cromatidi si sono separati longitudinalmente rimanendo però ancora attaccati al centromero il quale andrà incontro a divisione solo nella fase successiva (**anafase**). Infine, nella **telofase**, i cromatidi si sono separati completamente a formare 2 gruppi di cromosomi indipendenti.

TECNICHE DI STUDIO DEI CROMOSOMI

Bandaggio con Giemsa (G banding)

È la più comune tecnica citogenetica, in grado di conferire a ciascun cromosoma un caratteristico aspetto a bande chiare e scure (**figura 20**). I cromosomi vengono trattati con tripsina che ne denatura il contenuto proteico e quindi con il colorante Giemsa che

permette un'accurata analisi cromosomica attraverso la creazione di circa 400 bande. Ogni banda rappresenta però 4000-5000 Kb del DNA genomico. Se pensiamo che geni di dimensioni rilevanti non contengono più di 200 Kb, ci si rende conto come questo tipo di analisi sia ben lontana dall'offrire l'accuratezza di informazioni delle tecniche di biologia molecolare. Uno svantaggio metodologico delle tecniche di banding è poi rappresentato dalla necessità di operare su cellule in metafase, ottenibili quindi solo per mezzo di culture cellulari.

Ibridizzazione in situ

L'ibridizzazione in situ rappresenta il metodo più diretto per localizzare una sequenza di DNA su uno specifico cromosoma. È resa possibile dal fatto che una determinata sonda di DNA (costituita dalla sequenza che ci interessa) si ibridizza al segmento ad essa complementare in un cromosoma una volta denaturato. La sonda dovrà ovviamente essere marcata radioattivamente od essere resa fluorescente. Dopo averne rimosso la quantità in eccesso, la presenza e la posizione del DNA in questione verranno determinate dal segnale emesso dalla sonda.

Oggi giorno la tecnica più utilizzata è la cosiddetta **FISH** (fluorescent in situ hybridization). Il principale vantaggio dell'utilizzo di sonde fluorescenti risiede nel fatto che lo studio può essere condotto su nuclei in interfase, senza quindi la necessità di culture cellulari. Inoltre sono sufficienti campioni più piccoli rispetto a quelli richiesti dalle tecniche di mappaggio. Dopo ibridizzazione, il segnale viene visualizzato direttamente per mezzo di un microscopio a fluorescenza. Un ulteriore vantaggio di questa tecnica è rappresentato dalla possibilità di utilizzo simultaneo di più sonde purché marcate ciascuna con un differente fluorocromo. L'applicazione di questo sistema a fluorescenza "multi-colori" ai cromosomi in interfase (che sono peraltro molto più dispersi rispetto a quelli in metafase), consente di rivelare la posizione di più cromosomi o geni simultaneamente (Brock D.J.H., 1993).

Esistono essenzialmente 3 tipi di sonde utilizzabili nella FISH:

1. Sonde specifiche per sequenze centromeriche di ciascun cromosoma

La peculiarità delle regioni del centromero ha consentito l'approntamento di sonde specifiche per ciascun cromosoma, in grado di produrre un segnale luminoso molto

intenso. Il limite di questo approccio e' rappresentato dal fatto che solo variazioni numeriche dei cromosomi possono essere identificate con accuratezza, senza informazione alcuna sui cambiamenti strutturali di ciascun cromosoma quali delezioni e traslocazioni (**figura 21**).

2. *Sonde specifiche per l'intera struttura cromosomica o "chromosome painting"*

Il termine deriva dal fatto che questa tecnica utilizza intere sequenze di ciascun cromosoma, digerite in piu' frammenti e rese fluorescenti, che andranno ad ibridizzarsi su ciascun cromosoma con il risultato di "colorarlo" lungo tutto il suo decorso. Si possono cosi' rendere evidenti alterazioni strutturali a carico di ciascun cromosoma (**figura 21**).

3. *Sonde specifiche per frammenti di DNA di un cromosoma (cosmid probes)*

La clonazione di larghi frammenti di DNA su particolari vettori (i cosiddetti cosmidi) ne ha permesso l'utilizzo nella FISH. La **figura 21** illustra come, utilizzando quale sonda un determinato tratto di DNA cromosomico (il limite di risoluzione della metodica e' di frammenti di 45 Kb, quindi dell'ordine di grandezza di un gene) sia possibile determinare la posizione o l'eventuale delezione di un gene (Sanberg A.A. and Berger C.S., 1994).

ANOMALIE CROMOSOMICHE NEI TUMORI E LORO NOMENCLATURA

Si puo' dire che qualsiasi anomalia cromosomica descritta nelle malattie geneticamente trasmesse non sia estranea al genoma tumorale. Le anomalie cromosomiche possono essere suddivise in **numeriche** e **strutturali** e sono illustrate nella **tabella 14**. Anomalie numeriche comprendono l'acquisizione o la perdita di uno o piu' cromosomi configurando la cosiddetta aneuploidia, oppure la presenza di multipli di un numero aploide di cromosomi (poliploidia). Le anomalie strutturali invece sono il risultato della rottura di cromosomi con conseguente riunione dei frammenti in diverse configurazioni (Mueller R.F. e Young I. D., 1995).

Per convenzione ciascun braccio di un cromosoma viene suddiviso in regioni ed a sua volta ciascuna regione puo' essere suddivisa in bande (identificabili appunto attraverso le tecniche di "banding"), numerate sempre in modo progressivo a partire dal centromero (**figura 19**). Un dato punto su un cromosoma e' pertanto designato dal numero del cromosoma, dal relativo braccio ("p" o "q"), dal numero della regione e dal numero della

banda. Il segno + o - quando precede il numero del cromosoma indica la presenza di un intero cromosoma in piu' od in meno, mentre quando e' messo dopo il cromosoma indica l'acquisizione o la perdita di parte di quel cromosoma (es. -9 = assenza del cromosoma 9; 9 q - = assenza del braccio lungo del cromosoma 9). Il tipo di anomalia cromosomica viene siglata con le abbreviazioni riportate nella tabella 12. Per fare un esempio estremo, l'abbreviazione "t (2;4) (p23;q25)" indichera' una traslocazione reciproca che coinvolge il braccio corto del cromosoma 2 alla regione 2 banda 3 ed il braccio lungo del cromosoma 4 alla regione 2 banda 5 (ISCN, 1985).

BIBLIOGRAFIA

Brock D.J.H. Molecular genetics for the clinician. Cambridge University Press. 1993.

ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclatures. Karger, Basel. 1985.

Mueller R.F. e Young I.D. Emery's elements of medical genetics. Ninth Edition. Churchill Livingstone. 1995.

Sanberg A.A. and Berger C.S. Review of chromosome studies in urological tumours. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. J. Urol 1994; 151: 545-560.

CAP. 12: ANOMALIE CROMOSOMICHE NEI TUMORI UROTELIALI

INTRODUZIONE

Gli studi di citogenetica sui carcinomi vescicali incominciarono nel periodo in cui era stato osservato che alcune forme di leucemie presentavano spesso come unica caratteristica genomica una o più anomalie cromosomiche (Sandberg A.A., 1980). Le speranze di riscontrare una situazione citogenetica simile si andarono però ben presto affievolendo. Apparve subito chiaro come il tumore vescicale (e con esso molti altri tumori epiteliali) era spesso associato a modificazioni multiple ed alquanto complesse dell'assetto cromosomico, anche se alcuni di questi cambiamenti sembravano ricorrere con una certa frequenza.

A tutt'oggi non è stato identificato un vero e proprio "marker" citogenetico del tumore vescicale assimilabile al cromosoma Philadelphia nella leucemia mieloide cronica. Per di più gli studi di biologia molecolare, andando a scandagliare nei meandri di singoli geni coinvolti nella cancerogenesi, hanno rimpiazzato di gran lunga le indagini citogenetiche tradizionali, in grado di fornire solo informazioni su eventi genetici molto grossolani se pensiamo che una banda cromosomica è composta da centinaia di geni.

Pur tuttavia, a sostegno dell'importanza di ciò che andremo illustrando, stanno alcune considerazioni:

1. Un'alterazione cromosomica, quando ripetuta e costante, può essere la spia di una attivazione oncogenica (verificatasi per esempio ad opera di una traslocazione di un braccio o di una regione) o di un'inattivazione di un gene soppressore di tumore (che si trovi per esempio in un cromosoma od in un suo braccio andati incontro a delezione). I geni soppressore di tumore CDKN2 ed INK4B sono stati dapprima postulati e poi successivamente mappati sul cromosoma 9 grazie al frequente riscontro citogenetico di una monosomia a carico di questo cromosoma nei tumori vescicali.
2. Le indagini citogenetiche sui TCC possono avere un significato prognostico in quanto un aumento nel numero di cromosomi (iperdiploidia) si è visto correlarsi con una maggiore aggressività oncologica, mentre i tumori superficiali sono usualmente diploidi. Anche il numero di anomalie cromosomiche può essere un indicatore del

comportamento biologico della neoplasia, poiché, come vedremo tra poco, i tumori vescicali ben differenziati presentano un numero di gran lunga minore di alterazioni citogenetiche rispetto a quelli di grado elevato.

3. In più il continuo perfezionamento delle tecniche di ibridizzazione in situ (vedi ad esempio le sonde “cosmidi”) consente oggi di visualizzare una sequenza di DNA relativamente piccola su un dato cromosoma, riducendo di molto l’enorme distanza che separava le tecniche citogenetiche da quelle di biologia molecolare.
4. Da ultimo va ricordato che le metodologie oggi adottate per lo studio dei cromosomi, in particolare la FISH, sono relativamente poco complesse dal punto di vista tecnico e forniscono risultati in tempi ragionevolmente rapidi.

LE ALTERAZIONI CROMOSOMICHE DI PIU’ FREQUENTE RISCONTRO NEI TCC

A seconda del tipo di tecnica di laboratorio impiegata, i diversi studi si sono incentrati su variazioni numeriche di alcuni cromosomi, oppure su alterazioni strutturali sia “macroscopiche” (delezioni o traslocazioni di interi bracci) che “microscopiche” (delezione di una banda o di un singolo gene).

In alcuni casi è facile associare la delezione di una parte di cromosoma alla perdita di un locus oncogenico noto. Ad esempio è molto probabile che il significato oncologico della perdita del braccio lungo del cromosoma 13 possa risiedere nella delezione del gene RB che è stato mappato proprio in posizione 13q. Il significato di molte altre alterazioni cromosomiche nei TCC è invece per lo più sconosciuto. Si ipotizza per esempio che la perdita del cromosoma 11 o del suo braccio corto (11p), un evento che pare giocare un ruolo nella progressione dei TCC, possa riflettere l’inattivazione di un gene soppressore di tumore che però non è stato tuttora identificato (Voorter E.M., 1996).

La **tabella 15** illustra le anomalie cromosomiche di più frequente riscontro nei tumori uroteliali, indicando la probabile connessione con oncogeni già noti quando possibile.

Cromosoma 9

Le alterazioni strutturali riguardano prevalentemente la perdita di parti o dell'intero cromosoma (-9). L'osservazione frequente di tale riscontro già nelle forme di TCC superficiale ha indotto a pensare che questo cromosoma svolga un ruolo chiave nell'oncogenesi del tumore vescicale. I due geni soppressore di tumore (CDKN2 ed INK4B) identificati e caratterizzati su detto cromosoma (Simoneau, 1996) sono stati trattati nel capitolo 10. La perdita dell'intero cromosoma è stata descritta come la sola anomalia citogenetica in un numero significativo di tumori vescicali (Gibas, 1984).

Cromosoma 7

La trisomia del cromosoma 7 (+7) è un evento alquanto frequente nei TCC vescicali, riscontrandosi in più del 60% (Sauter, 1997). Dal momento che può rappresentare la sola anomalia in numerosi tipi di tumori umani oltre ai TCC, è stato ipotizzato che possa svolgere un ruolo cruciale nell'iniziazione tumorale (Sandberg, 1994). La trisomia del 7 appare essere l'evento più frequente nei TCC superficiali assieme a -9 (Perucca D, 1990; Yikogi, 1996).

Cromosoma 8

La delezione di 8p è indiscutibilmente un evento peculiare nei TCC vescicali come osservato da vari autori (Knowles, 1993; Wagner, 1997). Gli studi di mapping hanno rivelato numerosi siti di delezione che ricorrono con una certa frequenza e che potrebbero pertanto ospitare geni soppressori di tumore tuttora sconosciuti (Fujiwara, 1993). La significativa frequenza di delezioni negli stadi T1 rispetto a quelli Ta porta a concludere che si tratti di geni soppressori di tumore coinvolti nello sviluppo di un fenotipo invasivo (Wagner, 1997).

Cromosoma 11

Delezioni di questo cromosoma ed in particolare di 11p sono stati tra i primi eventi citogenetici descritti nel carcinoma vescicale (Fearon, 1985). 11p- si riscontra in circa il 40% dei casi (Knowles, 1994). Alcuni studi sembrano suggerirne un'associazione preferenziale con i tumori di grado elevato (Voorter, 1996). Il mappaggio dettagliato delle delezioni ha permesso di identificare una regione critica in cui dovrebbe trovarsi un

gene che e' tutt'oggi sconosciuto (Shaw, 1995). Questa regione non include in ogni caso quella in cui si trova l'oncogene RAS (sito appunto sul cromosoma 11), da alcuni in passato correlato alle alterazioni di questo cromosoma.

Cromosoma 17

L'eterogeneita' del cromosoma 17 nei TCC e' stata oggetto di diversi studi (Olumi, 1990; Sauter, 1995). Il motivo di questo interesse risiede nella localizzazione del gene per la p53 sul braccio corto (17p). Utilizzando la FISH con sonde centromeriche si e' visto che la trisomia di 17 (+17) e' un evento citogenetico straordinariamente frequente nei tumori vescicali anche di basso stadio (Yokogi, 1996). +17 si associa inoltre costantemente alla positivita' immunoistochimica per la p53 (Pycha, 1997). Questo fatto e' in apparente contrasto con gli studi di biologia molecolare che riportano al contrario una frequente delezione del locus genico p53 (vedi capitolo 10): correlare la presenza di multiple copie cromosomiche con l'inattivazione di un gene soppressore risulta concettualmente difficile da spiegare.

La trisomia del 17 appare implicata nel comportamento aggressivo dei TCC vescicali e si associa in modo significativo con un pattern citoflussimetrico di tipo aneuploide (Yokogi, 1996).

Assenza del cromosoma Y

La mancanza del cromosoma Y e' un evento di riscontro alquanto frequente (80%) nelle cellule del midollo osseo di maschi sani dopo i 70 anni di eta' (Sandberg, 1980). E' possibile che l'elevato turnover delle cellule midollari, necessario al fine di mantenere un numero sufficiente di cellule ematiche, si traduca, in eta' avanzata, in una perdita del cromosoma Y. La delezione del cromosoma Y pare pero' verificarsi in modo non casuale anche in leucemie ed in altri tumori. In piu', i nuclei di cellule uroteliali normali ritengono il cromosoma Y anche in soggetti di eta' avanzata (Sandberg, 1977). Pertanto il genotipo -Y, presente complessivamente in circa il 50% dei casi di TCC di tutti gli stadi (Sandberg, 1980), non e' un evento correlabile all'eta' dei soggetti. Piu' del 65% dei TCC -Y sono di grado elevato. E' possibile che tumori attivamente proliferanti abbiano

un turnover simile a quello delle cellule midollari degli anziani e che questo fatto predisponga alla perdita dell'eterocromosoma maschile (Sandberg, 1994).

In un altro studio improntato sull'analisi dei cromosomi sessuali, il 40% dei soggetti portatori di TCC vescicale presentava assenza di almeno un eterocromosoma (X o Y). Gli autori riportavano una tendenza di questi tumori ad andare incontro più rapidamente a progressione (Powell, 1990).

Alterazioni cromosomiche multiple nei TCC superficiali

La constatazione che i TCC di stadio Ta presentano un numero significativamente ridotto di alterazioni cromosomiche rispetto ad i T1 (Richter, 1997) deve indurre ad una seria riflessione sull'opportunità di continuare a considerare queste due entità istologiche simili dal punto di vista prognostico. Questo fatto riflette senza dubbio la maggiore instabilità genetica dei tumori superficialmente infiltranti.

Nello studio condotto da Richter (1997) utilizzando la tecnica di ibridizzazione genomica comparativa, i tumori vescicali di stadio Ta presentavano alterazioni genotipiche prevalentemente a carico del cromosoma 9 (perdita di 9p nel 54% e di 9q nel 28%), di Y (-Y nel 28%) e del cromosoma 1 (1q+ nel 14%). Negli stadi T1, 1q+ costituiva il più frequente riscontro (54%), ma delezioni di materiale genetico erano altresì riscontrabili a carico dei cromosomi 11, 3, 6, 8, 10 e 12. Curiosamente, delezioni di 9q erano invece significativamente meno frequenti rispetto ai Ta, facendo ipotizzare che probabilmente alcuni tumori in stadio T1 non derivino da cloni cellulari neoplastici progrediti dallo stadio Ta ma siano già dei T1 ab initio. Secondo un altro studio, TCC superficiali (Ta) non recidivanti presentano la sola monosomia 9, mentre le forme recidivanti acquisiscono una trisomia del cromosoma 7 (62%) e 17 (46%) (Pycha A., 1997).

Queste osservazioni rivestono un interesse peculiare soprattutto in considerazione del fatto che, negli stadi iniziali (Ta e T1), l'espressione di proteine oncogeniche (vedi ad esempio la p53) è spesso assente e quindi inutilizzabile ai fini prognostici.

CONCLUSIONI

L'utilizzo dei marcatori cromosomici nei TCC, quando ristretto allo studio delle forme superficiali, permette di rivelare precoci alterazioni nel comportamento neoplastico. In questo senso gli studi citogenetici e di ibridizzazione offrono informazioni che tante volte sfuggono alle tecniche di biologia molecolare. Ciò è dovuto al fatto che gli eventi genici alla base di molte delezioni o duplicazioni cromosomiche sono ancora per lo più sconosciuti. In attesa che questo "gap" venga colmato dalla scoperta di nuovi oncogeni o geni soppressori di tumore, lo studio dei cromosomi rappresenta per ora una valida alternativa nel catalogare i TCC in categorie prognostiche.

BIBLIOGRAFIA

Fearon E.R. et al. Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer. *Nature* 1985; 318: 377-380.

Fujiwara Y. et al. Evidence for the presence of two tumor suppressor genes on chromosome 8p for colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 1172-1174.

Gibas Z. et al. Nonrandom chromosomal changes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1984; 44: 1257-1261.

Knowles M.A. et al. Identification of multiple molecular genetic alterations in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 63: 140A.

Knowles M.A., Shaw M.E., Proctor A.J. Deletion mapping of chromosome 8 in cancers of the urinary bladder using restriction fragment length polymorphisms and microsatellite polymorphisms. *Oncogene* 1993; 8: 1357-1364.

Knowles M.A. et al. Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 531-538.

Olumi A.F. et al. Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Res* 1990; 50: 7081-7086.

Perucca D. et al. Molecular genetics of human bladder carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 49: 143-156.

Powell I., Tyrkus M. and Kleer E. Apparent correlation of sex chromosome loss and disease course in urothelial cancer. *Cancer Genet Cytogen* 1990; 50: 97-104.

Presti J.C., Reuter V.E., Galan T., Fair W.R., Cordon Cardo C.: Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res.* 51: 5405, 1991.

Pycha A. et al. Fluorescence in situ hybridization identifies more aggressive types of primarily noninvasive (stages pTa) bladder cancer. *J Urol* 1997; 157: 2116-2119.

Richter J. et al. Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Res* 1997; 57: 2860-2864.

Sandberg A.A. Chromosome markers and progression in bladder cancer. *Cancer Res* 1977; 37: 2950-2955.

Sandberg A.A. *The chromosomes in human cancer and leukemia.* New York, Elsevier, 1980.

Shaw M.E. and Knowles M.A. Deletion mapping of chromosome 11 in carcinoma of the bladder. *Genes, Chromosomes and cancer* 1995; 13: 1-8.

Simoneau A.R. Evidence for two tumor suppressor loci associated with proximal chromosome 9p to q and distal chromosome 9q in bladder cancer and the initial screening for GAS1 and PCT mutations. *Cancer Research* 1996; 56: 5039-5043.

Sauter G. et al. DNA aberrations in urinary bladder cancer detected by flow cytometry and FISH. *Urol Res* 1997; 25 (suppl 1): S37-S43.

Voorter E.M., Ummelen M.I.J., Ramaekers F.S.C. and Hopman A.H.N. Loss of chromosome 11 and 11 p/q imbalances in bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization. *Int J Cancer* 1996; 65: 301-307.

Wagner U. et al. Chromosome 8p deletions are associated with invasive tumor growth in urinary bladder cancer. *Am J Pathol* 1997; 151 (3): 753-759.

Yokogi H. et al. Genomic heterogeneity in bladder cancer as detected by fluorescence in situ hybridization. *Br J Urol* 1996; 78: 699-703.

CAP. 13: LA CITOFLUSSIMETRIA DEL DNA

INTRODUZIONE

La citoflussimetria puo' essere considerata una metodica di studio **quantitativo**, che permette di calcolare il contenuto di DNA di nuclei cellulari utilizzando tecniche fluorimetriche. Le apparecchiature attualmente disponibili, dette citometri a flusso, consentono pero' di evidenziare variazioni nel contenuto di DNA che siano almeno del 4%, pari cioe' a quello contenuto in 2 cromosomi. In molti tumori, le uniche alterazioni genomiche rilevabili con le metodiche descritte nei precedenti capitoli possono talvolta consistere semplicemente nella delezione di un singolo gene, oppure di una banda od anche di un braccio cromosomico, tutti ordini di grandezza comunque ancora al di sotto del limite di risoluzione della tecnica che andiamo trattando.

Date queste premesse, e' indubbio come qualsiasi delle metodiche di studio dei cromosomi che abbiamo descritto nel capitolo 11 sia in grado di offrire di per se stessa una valutazione del genoma molto piu' accurata non solo dal punto di vista qualitativo ma anche quantitativo.

I risultati citoflussimetrici, espressi sotto forma di istogrammi che illustrino il contenuto di DNA di un certo numero di cellule, costituiscono quindi un metodo grossolano di screening del grado di malignita' tumorale. In piu' l'apparecchiatura comporta dei costi non indifferenti.

Da dove deriva allora l'enorme successo della citoflussimetria nello studio dei tumori ed in particolare nei TCC? La citoflussimetria, a discapito delle premesse sopra esposte, offre 3 vantaggi:

1. Permettendo di analizzare il contenuto di DNA di migliaia di nuclei cellulari in pochi minuti e quindi la presenza di diversi cloni cellulari con differente contenuto di DNA, offre dei risultati che tengono conto dell'eterogeneita' tumorale, contrariamente a tutte le tecniche sinora trattate (siano esse di biologia molecolare o citogenetiche), le quali sono ristrette ad un campione tissutale estremamente ridotto.

2. Inoltre, calcolando il numero esatto di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare ed in particolare nella fase S, e' in grado di quantificare la proliferazione cellulare (la cosiddetta percentuale di fase S).
3. Infine questa metodica, gorssolana o meno che sia, ha dimostrato una buona correlazione con la prognosi, particolarmente nei tumori vescicali, tanto da essere ormai impiegata anche nella routine diagnostica.

METODICA

Un citometro a flusso e' in grado di determinare con notevole precisione il contenuto di DNA di 10.000-100.000 nuclei cellulari in pochi minuti. Un raggio luminoso (costituito da un laser nelle apparecchiature di ultima generazione) eccita la fluorescenza emessa dai nuclei previamente colorati con fluorocromi e quest'ultima viene misurata da detettori che trasmettono a loro volta il segnale ad un'apparecchiatura elettronica connessa con un computer (Camplejohn R.S., 1992).

Materiale idoneo per l'indagine puo' essere rappresentato, nel caso del tumore vescicale, da tessuto tumorale fresco, da cellule di lavaggio vescicale e da campioni inclusi in paraffina, anche se in quest'ultimo caso la qualita' dei risultati ottenuti e' inferiore.

I tessuti vengono sottoposti a disintegrazione meccanica ed a trattamento enzimatico al fine di ottenere una sospensione di soli nuclei cellulari (Tribukait B., 1987). Tra i vari fluorocromi disponibili, il piu' utilizzato e' il propidio iodide, il quale ha la proprieta' di intercalarsi tra le basi del DNA. Solitamente viene misurato il contenuto di DNA in almeno 10^5 nuclei cellulari, una procedura che non richiede piu' di 1-2 minuti (Camplejohn R.S., 1994). Uno dei limiti di questa metodica cosiddetta "dinamica" e' costituito dalla non selettivita' dei tipi cellulari, per cui anche cellule non neoplastiche quali i linfociti, che spesso infarciscono aree tumorali, vengono inevitabilmente a fare parte della valutazione quantitativa.

PARAMETRI CITOFUSSIMETRICI

Introduzione

Abbiamo già ricordato nel capitolo precedente come la cellula normale contenga un numero diploide di cromosomi (46) durante la fase di quiescenza, mentre durante la replicazione cellulare (fase S) e nella mitosi (fase G2 + M) tale contenuto raddoppi al fine di garantire un eguale patrimonio genetico alle cellule figlie. La cellula neoplastica invece tende a sviluppare alterazioni quantitative del patrimonio genetico, dando origine alla cosiddetta aneuploidia.

Ploidia

Il citofluorimetro esprime il contenuto di DNA di una data popolazione cellulare sotto forma di rappresentazione grafica ad istogrammi. L'istogramma rappresentato nella **figura 22A** potrebbe appartenere ad una qualsiasi cellula normale, dotata di un basso turnover replicativo, come ad esempio una cellula uroteliale. In questo caso, la quasi totalità delle cellule si trova nella fase G0/G1 del ciclo e mostra un contenuto di DNA **diploide** ($2c = 46$ cromosomi). Le pochissime cellule che si trovano invece nella fase di replicazione del loro patrimonio genetico (fase S) costituiscono una curva appena accennata ed irregolare distribuita tra $2c$ e $4c$. Un numero ancora più esiguo di cellule ha infine ultimato la replicazione del DNA ed è in fase mitotica (fasi G2/M).

Il limite (o la semplificazione) della rappresentazione ad istogrammi consiste nel fatto che le popolazioni cellulari con un singolo picco che non devia oltre il 10% (cioè di un fattore di $0,2c$) dal punto definito come diploide ($2c$), sono considerate diploidi. Questo spiega perché molti tumori possono essere classificati come diploidi dal punto di vista citofluorimetrico benché all'indagine citogenetica presentino senz'altro una qualche alterazione del contenuto cromosomico. Nell'interessante lavoro di Matsuyama, 15 TCC vescicali diploidi su 17 presentavano almeno una singola aberrazione cromosomica tra cui trisomia del 7, monosomia del 9 e trisomia del 10, mentre gran parte dei tumori aneuploidi manifestava almeno 2 alterazioni cromosomiche.

Popolazioni cellulari che presentino 2 picchi di distribuzione differenti di almeno $0,2c$ possono essere distinte tra di loro e gli istogrammi relativi verranno definiti **aneuploidi monoclonali** in presenza di una singola popolazione aneuploide (**figura 22B**) od aneuploidi **policlonali** in caso di più popolazioni aneuploidi (**figura 22C**). Infine, un istogramma con un picco G2+M del 15% definisce una popolazione cellulare **tetraploide** (**figura 22D**) (Gustafsson H., Tribukait B., 1985).

DNA index (DI)

Un altro parametro che viene fornito dall'analisi citofluorimetrica e' il cosiddetto **indice di DNA**, cioe' il rapporto fra il contenuto di DNA delle cellule G0/G1 della popolazione anomala ed il contenuto di DNA delle cellule G0/G1 di una popolazione diploide. Quest'ultima, utilizzata come standard interno, puo' essere costituita da cellule normali dello stesso tessuto oppure, come piu' spesso avviene, da linfociti umani periferici.

Per definizione il DNA index delle cellule diploidi e' di 1.00, mentre le cellule aneuploidi potranno avere un DI rispettivamente > di 1.00 (iperdiploidi) o < di 1.00 (ipodiploidi). Le cellule tetraploidi avranno invece un DNA index di 2.00 (Dean P.N., 1980).

Percentuale di fase S (SPF)

Dagli istogrammi di DNA ottenuti tramite analisi citofluorimetrica, oltre allo stato di ploidia e' possibile determinare la distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo. Generalmente si identificano percentualmente la frazione di cellule che stanno replicando o che hanno gia' duplicato il proprio DNA (fase S e G2M). Tale valore viene determinato mediante algoritmi matematici che quantificano la fluorescenza emessa dai nuclei delle cellule (Baisch H., 1975). Uno degli svantaggi principali della citofluorimetria a DNA come metodo di determinazione dell'attivita' proliferativa e' che parte degli istogrammi sono ininterpretabili e pertanto la SPF risulta calcolabile solo nel 70-75% dei casi (Camplejohn R.S., 1994).

PARAMETRI CITOFUSSIMETRICI UTILIZZATI NEI TCC

Nel 1993, una Consensus Review sull'utilita' degli studi citofluorimetrici nei TCC vescicali stabiliva le linee guida per un'omogenea e corretta interpretazione dei risultati in questo tumore. In particolare, si raccomandava di prendere in considerazione le varie sottoclassi di aneuploidia (monoclonale, policlonale, tetraploidia...), il DNA index ed anche la cosiddetta HPF o frazione iperdiploide, che rappresenta la % di cellule aneuploidi in una data popolazione cellulare (Weeless L.L., 1993).

Yakulis e coll. (1995), osservando tutte le variazioni di ploidia in 45 tumori vescicali superficiali seguiti con applicazioni seriate dell'analisi citofluorimetrica in un periodo di follow up medio di 15 mesi e correlandole con i fattori prognostici tradizionali, hanno

potuto stabilire un ordine crescente di malignita'. Il seguente ordine di parametri (diploidia, aneuploidia peridiploide, tetraploidia, ipotetraploidia ed ipertetraploidia) si associa ad un progressivo incremento della fase S e del grado tumorale. L'ipertetraploidia in particolare e' una caratteristica dei tumori tendenti alla progressione ed alla metastatizzazione.

Molti autori sono concordi nel considerare un intervallo di DNA index compreso tra 1,5 e 2 come parametro frequentemente associato con TCC avanzati ed aggressivi (Jacobsen A.B., 1992; Miao T., 1992; Bittard H., 1996), anche se pero' l'utilizzo di una classificazione per il DNA index non viene applicata routinariamente.

Nel prossimo capitolo vedremo come ,ai fini pratici, i parametri piu' largamente utilizzati nelle varie rassegne sui tumori vescicali sono essenzialmente la ploidia, nelle 2 sottoclassi diploidia/aneuploidia, e la % di fase S.

BIBLIOGRAFIA

Baisch H., Ohde W., Linden W.A. Analysis of PCP-data to determine the fraction of cells in various phases of cell cycle. *Radiat Environ Biophys* 1975; 12: 31-39.

Bittard H., Lamy B. and Billery C. Clinical evaluation of cell deoxyribonucleic acid content measured by flow cytometry in bladder cancer. *J Urol* 1996; 155: 1887-1891.

Camplejohn R.S. Flow cytometry in clinical pathology. In: Herrington C.S. and McGee J.O.D. (eds), *Diagnostic Molecular Pathology: A Pratical Approach*. Oxford: IRL Press. 1992.

Camplejohn R.S. DNA flow cytometry. In: J. Crocker (ed), *Molecular biology in histopathology*. John Wiley & Sons Ltd. 1994.

Dean P.N. A siplefied method of DNA distribution analysis. *Cell Tissue Kinetic* 1980; 13: 299-308.

Gustafsson H., Tribukait B. Characterization of bladder carcinomas by flow DNA analysis. *Eur Urol* 1985; 11: 410-417.

Jacobsen A.B. et al. The prognostic significance of of deoxyribonucleic acid flow-cytometry in muscle invasive bladder carcinoma treated with preoperative irradiation and cystectomy. *J. Urol* 1992; 147: 34-39.

Matsuyama H. Nonrandom numerical aberrations of chromosomes 7, 9 and 10 in DNA-diploid bladder cancer. *Cancer Gen Cytogen* 1994; 77(2): 118-124.

Miao T. et al. Clinical significance of flow cytometric deoxyribonucleic acid measurements of deparaffinized specimens in bladder tumours. *Eur Urol* 1992; 21: 98-104.

Norming U. DNA flow cytometry: an update of its use in assessing prognosis for transitional cell cancer of the bladder. *Semin Urol* 1993; 3: 154-163.

Tribukait B. Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of genito urinary neoplasms. *World J Urol* 1987; 5: 108-122.

Weeless L.L., Badalament R.A., de Vere White R.W., Fradet Y. and Tribucait B. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in bladder cancer. Reports of the DNA Cytometry Consensus Conference. *Cytometry* 1993; 14: 478-485.

Yakulis R. et al. Origins and clinical implications of aneuploidy in early bladder cancer. *Cytometry* 1995; 22 (4): 307-316.

CAP. 14: UTILITA' DELLA CITOFLUSSIMETRIA NEI TCC

LA CITOFLUSSIMETRIA COME METODICA DIAGNOSTICA SU CAMPIONI URINARI

La citoflussimetria puo' essere considerata in linea teorica un utile complemento all'esame citologico urinario, in quanto fornisce informazioni "quantitative" che aiutano nell'interpretazione "visiva" della morfologia cellulare.

Analizzando un totale di 1034 campioni urinari e di lavaggio vescicale nel follow up di carcinomi transizionali vescicali, Slaton e coll. (1997) hanno riscontrato che solo il 2% dei soggetti con citologia normale aveva anomalie della ploidia e tra questi in un solo caso era presente la recidiva neoplastica. Pur tuttavia, variazioni della ploidia aumentano significativamente la capacita' di diagnosticare la presenza di tumore nei campioni con displasia citologica. Nei casi invece di generiche "atipie" all'esame citologico, il concomitante riscontro di cellule transizionali aneuploidi si associa in un 30% dei casi alla presenza di recidiva contro un 5% nei campioni diploidi.

La capacita' della citoflussimetria di predire la risposta al trattamento con BCG e' risultata essere superiore rispetto alla citologia tradizionale. In particolare un cambiamento dallo status aneuploide a quello diploide nelle cellule di lavaggio vescicale dopo terapia e' indice di prognosi favorevole (Bretton P.R., 1989).

Va pero' sottolineato che l'analisi citoflussimetrica, al contrario della citologia classica, necessita di un numero maggiore di cellule esfoliate quali si possono ottenere mediante "barbotage" vescicale, una manovra diagnostica di per se' abbastanza invasiva. Se si aggiungono poi i costi relativamente elevati della strumentazione, si deve concludere che questa indagine non offre per ora vantaggi significativi nel follow up dei TCC vescicali (O'Leary T.J., 1998).

CORRELAZIONE DEI PARAMETRI CITOFLUSSIMETRICI CON LA STADIAZIONE PATOLOGICA

La relazione tra le caratteristiche del DNA tumorale misurate mediante citoflussimetria e lo stadio/grado dei TCC e' stata riportata in diverse casistiche, con una sostanziale omogeneita' di risultati.

Ploidia

E' opinione pressoché' unanime in letteratura il fatto che la percentuale di genomi diploidi decresca in modo significativo con il progredire del grado istologico a favore di un incremento della quota aneuploide. Una situazione simile si osserva per lo stadio patologico, come illustrato nella **tabella 16**. Come regola generale, i tumori di grado 1 sono pressoché' tutti diploidi, mentre quelli di grado 3 sono prevalentemente aneuploidi. E' interessante notare l'incremento tutt'altro che trascurabile di forme aneuploidi nel passaggio dallo stadio Ta a quello T1, a conferma una volta di piu' della differente malignita' di questi due stadi che sono spesso raggruppati in una stessa categoria prognostica. Multiple popolazioni aneuploidi, di incidenza del tutto trascurabile nei bassi gradi, rappresentano circa il 50% dei tumori di grado 3 (Norming U., 1989). Il carcinoma in situ presenta un pattern di alterazioni sovrapponibili alle lesioni di grado 3 (Norming U., 1992). In una serie di biopsie vescicali random in mucosa macroscopicamente normale di 290 carcinomi vescicali, l'aneuploidia fu riscontrata nel 10% dei casi con riscontro microscopico negativo per atipie cellulari (Norming U., 1991), validando un indubbio ausilio della citoflussimetria nella diagnostica patologica.

Fase S

La proliferazione cellulare definita dalla % di fase S, aumenta con la progressione di stadio e di grado, anche se sembra correlarsi meglio con lo stadio (Tribukait B., 1987). Secondo Lipponen (1991), i tumori di grado 1 presentano una bassa fase S (<5%) mentre i gradi 3 hanno usualmente una fase S superiore al 10%. I valori di fase S dei gradi 2 si aggirano entro un range variabile dal 5 al 15% (Lipponen P.K., 1991). Le variazioni di fase S con la stadiazione non sono da tutti riportate come statisticamente significative (De Vita R., 1991).

VALORE PROGNOSTICO DEI PARAMETRI CITOFLUSSIMETRICI

Tumori superficiali (Ta-T1/G1-G2)

La **tabella 17** mostra come, dopo gli esaltanti risultati dei primi anni '90 che facevano della ploidia un marcatore ben correlato con la progressione e recidiva dei TCC vescicali superficiali, gli studi piu' recenti abbiano frenato di molto gli entusiasmi. Di Silverio e coll. (1992) riportano come lo status di ploidia nei Ta-T1 costituisca, insieme al numero di recidive, il maggior fattore predittivo di progressione.

Molti degli studi iniziali sono pero' inficiati dal fatto che fattori prognostici di peso rilevante, quali la focalita' tumorale, non vengono presi in considerazione. Lipponen (1992) commenta che la correlazione tra tempo libero da recidiva e ploidia e' da considerarsi al momento inconclusiva. Vindelov e coll. (1995) smentiscono le osservazioni di de Vere White et al. (1988), secondo cui tutti i Ta-T1 superficiali aneuploidi andrebbero incontro a recidiva, ma ammettono che il tasso di recidiva e' significativamente inferiore nei tumori diploidi e con bassa fase S. L'unica casistica rilevante in cui viene utilizzata l'analisi multivariata fa riferimento alla sopravvivenza come end-point, e pertanto la quota di tumori superficiali non risulta analizzabile poiche' il tasso di mortalita' per patologia, come del resto prevedibile, e' troppo basso (Bittard, 1996).

Manca pertanto a tutt'oggi uno studio definitivo che sancisca l'opportunita' di inserire l'analisi della ploidia tra le indagini di studio da condurre parallelamente all'esame istologico nelle forme superficiali.

Tumori di stadio Ta-T1/G3 e CIS

Poiche' quasi tutti i tumori di grado 3 sono aneuploidi, risulta superflua una classificazione tra forme diploidi ed aneuploidi, mentre potrebbe avere senso dal punto di vista prognostico distinguere i tumori aneuploidi monoclonali da quelli policlonali.

La persistenza dello status aneuploide dopo trattamento topico con chemio-immunoterapia e' da alcuni associata a prognosi sfavorevole (Norming U., 1992a). Secondo Bittard (1996), l'aneuploidia associata a valori di DNA index compresi tra 1,5 e 2 costituisce un fattore prognostico aggiuntivo nel predire la sopravvivenza dei tumori vescicali solo per la categoria tumorale T1G3.

In uno studio condotto su 63 CIS, Norming e coll. (1992b) hanno riportato livelli di sopravvivenza a 5 anni rispettivamente del 67% negli aneuploidi monoclonali e del 20%

nei policlonali. Durante il follow up un 50% dei tumori monoclonali ha sviluppato multiple popolazioni aneuploidi. Sostanzialmente gli autori in questione distinguono 3 categorie prognostiche nei CIS: 1. Tumori con una singola popolazione aneuploide alla diagnosi e senza acquisizione di multiple popolazioni aneuploidi nel follow-up, a prognosi favorevole (94% di sopravvivenza a 5 anni). 2. Tumori aneuploidi monoclonali alla diagnosi con acquisizione di piu' popolazioni aneuploidi nel follow-up, in cui la sopravvivenza a 5 anni scende al 43% ed infine 3. CIS aneuploidi policlonali gia' alla diagnosi che presentano la prognosi peggiore (20% di sopravvivenza a 5 anni).

Tumori vescicali infiltranti e metastatici

In una casistica di 162 TCC vescicali sottoposti a cistectomia, il 6% di 34 tumori diploidi mostrava invasione linfonodale, contro il 34% dei 128 aneuploidi (Shaaban, 1990). In uno studio retrospettivo su 188 materiali di cistectomia inclusi in paraffina, nessun caso di diploidia era invece associato a metastasi linfonodale (Miao T., 1992). Le incertezze sulla validita' dell'indagine citoflussimetrica su preparati inclusi in paraffina si riflettono inevitabilmente sull'attendibilita' di questo ultimo studio.

Il valore prognostico di un marcatore tumorale, nel caso di tumori vescicali infiltranti, si esprime essenzialmente in un vantaggio in termini di sopravvivenza. Solo pochi dati e per giunta ottenuti su casistiche ridotte, sono a tutt'oggi disponibili sul rapporto tra ploidia e sopravvivenza nei TCC infiltranti. In una casistica di 53 pazienti trattati con radioterapia + cistectomia, lo status della ploidia, valutato sia su lavaggio vescicale che su preparati istologici, non ha dimostrato alcuna influenza sul tempo di sopravvivenza (Granfors T., 1996). Le conclusioni altrettanto deludenti da parte di altri autori (Aamodt R.L., 1992; Lipponen P.K., 1993) non lasciano dubbi alla constatazione che la citoflussimetria non e' un'indagine utile nel management clinico del TCC vescicali infiltranti.

Allo stesso modo, la ploidia del DNA non pare avere alcun valore predittivo sulla sopravvivenza della malattia vescicale metastatica. In una casistica di 22 TCC metastatici, la sopravvivenza media e' risultata addirittura inferiore negli 8 casi di tumore primario diploide (Badalament R.A., 1990). La constatazione di un tasso cosi' elevato di tumori diploidi in casi di malattia avanzata induce ad ascrivere la causa di risultati cosi' contraddittori al basso numero di osservazioni.

Al contrario, sopravvivenza e malattia metastatica possono essere previsti dalla fase S. Metastasi a distanza sono piu' comuni in tumori con fase S > del 10%. In quest'ultima categoria, la sopravvivenza a 10 anni e' del 30% contro il 70% quando la fase S e' < del 10% (Tribukait B., 1987; Lipponen P.K., 1991).

Nell'analisi mutivariata condotta da Vindelov (1995) una fase S > di 24,5% appare essere il fattore maggiormente correlato con la sopravvivenza, anche se lo stadio ed il grado risultano altresì parametri prognostici indipendenti.

La ploidia come indice predittivo di radiosensibilita' dei TCC vescicali

Benche' nessun studio randomizzato abbia sinora confrontato l'utilita' della radioterapia radicale nei confronti della cistectomia radicale, i risultati non eccellenti in termini di sopravvivenza ottenuti dalla chirurgia radicale hanno fatto si' che il trattamento radiante abbia continuato a costituire un'alternativa tuttora praticabile, da riservarsi in particolare ai pazienti ad elevato rischio operatorio.

La presenza di multiple popolazioni aneuploidi era stata indicata quale fattore di scarsa radioresponsivita'. Nello studio di Jacobsen (1992) i tumori dotati di prognosi migliore erano quelli tetraploidi, mentre i tumori diploidi avevano un tasso di sopravvivenza a 5 anni solo del 14%. In un altro studio invece, i carcinomi transizionali diploidi presentavano il piu' alto tasso di sopravvivenza dopo radioterapia (Wijkstrom H., 1984). Secondo i dati riferiti da Hug e coll. (1992), la sopravvivenza post-trattamento chemio-radioterapico sarebbe raddoppiata nei tumori aneuploidi rispetto a quelli diploidi.

Tante sono le controversie emerse dagli studi citoflussimetrici relativi a questo problema, che si puo' ragionevolmente concludere come anche in questo caso la ploidia sia priva di utilita' nel condizionare l'approccio terapeutico.

CONCLUSIONI

La citoflussimetria non sfugge alla consuetudine ormai consolidatasi nel corso di questa trattazione, dove ogni marcatore sembra attraversare un iter di studi che tra entusiasmi e delusioni finiscono poi per circoscrivere l'utilita' pratica.

Per riassumere in modo telegrafico quanto esposto in questo capitolo possiamo dire che l'utilità della citofluorescenza nei TCC è

1. ancora da definirsi per quanto riguarda i tumori superficiali
2. utile negli stadi Ta-T1/G3
3. del tutto inutile nei tumori infiltranti e metastatici.

BIBLIOGRAFIA

Aamodt R.L. et al. Flow cytometric evaluation of bladder cancer: recommendations of the NCI flow cytometry network for bladder cancer. *World J Urol* 1992; 10: 63-67.

Badalament R.A. et al. Flow cytometric analysis of primary and metastatic bladder cancer. *J Urol* 1990; 143: 912-916.

Bittard H., Lamy B., Billery C. Clinical evaluation of cell deoxyribonucleic acid content measured by flow cytometry in bladder cancer. *J Urol* 1996; 155: 1887-1891.

Blomjous E.C.M. et al. The value of morphometry and DNA flow cytometry in addition to classic prognosticators in superficial urinary bladder carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1989; 91: 243-248.

Bretton P.R. et al. Flow cytometry as a predictor of response and progression in patients with superficial bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guerin. *J Urol* 1989; 141: 1332-1336.

DeVere White R.W. et al. The predictive value of flow cytometric information in the clinical management of stage 0 (Ta) bladder cancer. *J Urol* 1988; 139: 279-282.

De Vita R. et al. Cellular DNA content and proliferative activity evaluated by flow cytometry versus histopathological and staging classifications in human bladder tumors. *Eur urol* 1991; 19: 65-73.

Di Silverio F. et al. Prognostic role of flow cytometry in superficial bladder cancer. *Eur Urol* 1992; 21 (suppl. 1): 22-25.

Granfors T. et al. Predictive value of DNA ploidy in bladder cancer treated with preoperative radiation therapy and cystectomy. *Scand J Urol Nephrol* 1996; 30: 281-285.

Gustafsson H., Tribukait B., Esposti P.L. DNA profile and tumor progression in patients with superficial bladder tumors. *Urol Res* 1982 (a); 10: 13-18.

Gustafsson H, TribukaitB, sposti P.L. DNA pattern, histological grade and multiplicity related to recurrence rate in superficial bladder tumors. *ScandJ Urol Nephrol* 1982; 16: 135-139.

Hamano K., Kinjo M., Kumazawa J. Flow-cytometric deoxyribonucleic acid analysis of the human bladder cancers with reference to histopathological findings. *Eur Urol* 1992; 22: 153-157.

Hug E.B. et al. Deoxyribonucleic acid flow cytometry in invasive bladder carcinoma: a possible predictor for successful bladder preservation following transurethral surgery and chemotherapy-radiotherapy. *J Urol* 1992; 148 (1): 47-51.

Jacobsen A.B. et al. The prognostic significance of deoxyribonucleic acid flow cytometry in muscle invasive bladder carcinoma treated with preoperative irradiation and cystectomy. *J Urol* 1992; 147: 34-37.

Lipponen P.K., Eskelinen M.J., Nordling S. Progression and survival in transitional cell bladder cancer: a comparison of established prognostic factors, S-phase fraction and DNA ploidy. *Eur J Cancer* 1991; 27: 877-881.

Lipponen P.K. Review of cytometric methods in the assessment of prognosis in transitional cell bladder cancer. *Eur Urol* 1992; 21: 177-183.

Lipponen P.K. et al. Flow cytometry in comparison with mitotic index in predicting disease outcome in transitional cell bladder cancer. *Int J Cancer* 1993; 53: 42-47.

Miao T. et al. Clinical significance of flow cytometric deoxyribonucleic acid measurements of deparaffinized specimens in bladder tumors. *Eur Urol* 1992; 21: 98-102.

Norming U., Nyman C.R., Tribukait B. Comparative flow cytometric deoxyribonucleic acid on exophytic tumor and random mucosal biopsies in untreated carcinoma of the bladder. *J Urol* 1989; 142: 1442-1447.

Norming U., Nyman C.R., Tribukait B. Comparative histopathology and deoxyribonucleic acid flow cytometry of random mucosal biopsies in untreated bladder carcinoma. *J Urol* 1991; 145: 1164-1168.

Norming U. et al. Deoxyribonucleic acid profile and tumor progression in primary carcinoma in situ of the bladder. A study of 63 patients with grade 3 lesions. *J Urol* 1992a; 147: 11-15.

Norming U. et al. Prognostic significance of mucosal aneuploidy in stage Ta/T1 grade 3 carcinoma of the bladder. *J Urol* 1992b; 148: 1420-1427.

O'Leary T.J. Flow cytometry in diagnostic cytology. *Diagn Cytopathol* 1998; 18 (1): 41-46.

Shaaban A.A. et al. Prediction of lymph node metastases in bladder carcinoma with deoxyribonucleic acid flow cytometry. J Urol 1990; 144: 884-887.

Slaton J.W. et al. Deoxyribonucleic acid ploidy enhances the cytological prediction of recurrent transitional cell carcinoma of the bladder. J Urol 1997; 153 (3 pt 1): 806-811.

Tetu B. et al. Prognostic significance of nuclear DNA content and S-phase fraction by flow cytometry in primary papillary superficial bladder cancer. Hum pathol 1996; 27 (9): 922-926.

Tizzani A. et al. DNA flow cytometry and Ki67 proliferating index as prognostic factors of early recurrence and progression in G1-G2/Ta-T1 and G3/Ta-T1 transitional cell carcinoma of the bladder. Min Urol Nefrol 1997; 49: 141-143.

Tribukait B. Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of genitourinary neoplasms. World J Urol 1987; 5: 108-122.

Vindelov L.L. et al. Prognostic significance of DNA content in bladder cancer based on flow cytometric analysis of 249 transitional cell carcinomas. Cytometry 1995; 22: 93-102.

Wijkstrom H., Gustafson H., Tribukait B. Deoxyribonucleic acid analysis in the evaluation of transitional cell carcinoma before cystectomy. J Urol 1984; 132: 894-898.

CAPITOLO 15: ESISTE UN MODELLO MOLECOLARE GENETICO CHE SPIEGHI LA PROGRESSIONE DEI TCC?

Al termine di questa trattazione sulle alterazioni genetiche dei TCC viene spontaneo chiedersi se sia possibile identificare un pattern di marcatori che scandisca le varie tappe dell'oncogenesi negli uroteliomi.

E' oltremodo ovvio, da quanto sinora esposto, che la progressione tumorale in genere si verifica attraverso l'acquisizione di un numero crescente di alterazioni genetiche (Weinberg R.A., 1989). Modelli di progressione genetica sono stati al momento postulati per i tumori colo-rettali (Fearon E.R. and Vogelstein B., 1990) e gli astrocitomi (Mikkelsen T., 1991). Per esempio, il passaggio da adenoma a carcinoma rettale invasivo e' stato messo in relazione con l'acquisizione di mutazioni a carico della p53, che si verificano tardivamente rispetto a mutazioni di RAS, del gene APC ed alle delezioni cromosomiche 5q e 18q. Queste ultime accompagnerebbero invece l'evoluzione delle cosiddette lesioni premaligne (Fearon E.R. and Jones P.A., 1992).

Il carcinoma transizionale della vescica potrebbe essere in teoria un modello di studio ideale per questo scopo, data la sua frequente manifestazione in forme superficiali con possibilita' di progressione istologica. Ad uno sguardo piu' attento al comportamento istologico dei TCC, ci si rende pero' conto come la maggior parte dei tumori superficiali (che sono circa l'80% alla presentazione) non manifestino alcuna propensione ad evolvere in forme invasive a scapito delle frequenti recidive. Del 20% di tumori che mostrano invasione muscolare al momento della presentazione, solo in pochi casi e' possibile identificare un precursore superficiale. Sulla base di studi condotti su mappaggi vescicali, circa 20 anni or sono Koss (1977) aveva postulato l'esistenza di due principali vie di sviluppo dei carcinomi vescicali, ben distinte tra loro: la maggior parte dei carcinomi infiltranti avrebbero come precursore il CIS, mentre solo un 10-20% deriverebbe dalla progressione di TCC superficiali multirecidivi (**figura 23**).

In realta' la storia naturale di queste due forme tumorali ipotizzate come essere distinte tra loro e' tutt'altro che chiara poiche' diversi elementi contribuiscono ad ingenerare ulteriore confusione. Innanzitutto la multifocalita' tumorale e la recidiva in sedi diverse dalla prima presentazione rendono difficile l'identificazione del tipo di lesione precursore

della forma infiltrante. La non infrequente coesistenza di CIS associato a lesioni papillari superficiali rende talvolta difficile escludere una diretta evoluzione del primo da queste ultime.

Un interessante studio molecolare condotto da Spruck e coll. (1994) ha in parte chiarito questo dilemma. Analizzando le mutazioni per il gene p53 e la perdita di materiale genetico sui cromosomi 9 e 17 in 216 tumori vescicali, questo gruppo di ricerca ha osservato come la p53 fosse alterata in piu' del 65% dei CIS che peraltro mostravano una bassa frequenza di delezioni a carico del cromosoma 9. Al contrario i tumori papilliferi superficiali, a fronte di una bassa frequenza di mutazioni del G.S.T. p53 (1 caso su 36) manifestavano una spiccata tendenza alla perdita di alleli sul cromosoma 9 (34%). I tumori infiltranti invece avevano un pattern di mutazioni per la p53 sovrapponibile a quello dei CIS ed in piu' una maggior incidenza di delezioni alleliche a carico del cromosoma 9.

Due sono le ipotesi conclusive che si possono avanzare a fronte di questi risultati:

1. Il CIS ed i tumori papillari superficiali sono due entita' che poco hanno a che fare tra di loro per il diverso assetto molecolare oltre che clinico-patologico.
2. I tumori vescicali infiltranti riconoscono il loro precursore istologico principale nei CIS, e l'evento molecolare "permissivo" potrebbe essere rappresentato dalla perdita di alleli sul cromosoma 9 (dove, lo ricordiamo, si trovano localizzati almeno due geni soppressori di tumore).

Non e' escluso che un mappaggio piu' dettagliato e seriato nel tempo delle lesioni vescicali attraverso l'utilizzo di multipli marcatori genici e cromosomici, possa chiarire meglio i meccanismi evolutivi nella carcinogenesi uroteliale, permettendo soprattutto di identificare quella quota di lesioni superficiali destinate ad evolvere in modo simile ai CIS.

BIBLIOGRAFIA

Fearon E.R. and Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61: 759-767.

Fearon E.R. and Jones P.A. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEP J.* 1992; 6: 2783-2790.

Koss L.G., Nakanishi I. and Freed S.Z. Nonpapillary carcinoma in situ and atypical hyperplasia in cancerous bladders: further studies of surgically removed bladders by mapping. *Urology* 1977; 9: 442-445.

Mikkelsen T., Cairncross J.C. and Cavenee W.K. Genetics of the malignant progression of astrocitoma. *J Cell Biochem* 1991; 46: 3-8.

Spruck C.H. et al. Two molecula pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1994; 54: 784-788.

Weinberg R.A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multisptep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; 49: 3713-3721.

PARTE TERZA

MARCATORI PROLIFERATIVI

CAP. 16: NOZIONI GENERALI SUI MARCATORI PROLIFERATIVI

INTRODUZIONE

Abbiamo già accennato nelle pagine introduttive a questa trattazione come una delle caratteristiche fenotipiche peculiari della cellula neoplastica sia proprio l'abnorme tasso proliferativo, espressione diretta dell'intoppo verificatosi nei meccanismi di controllo del ciclo cellulare, strettamente regolati su base genetica.

La misurazione della proliferazione cellulare con i metodi che andremo illustrando ci dice ben poco sul tasso di crescita di un dato tumore, che è un parametro dinamico, utile per calcolare per esempio il tempo di raddoppio di una massa tumorale. I cosiddetti “**indici proliferativi**” definiti attraverso svariate metodiche, sono semplicemente delle fotografie istantanee sullo stato proliferativo di un dato campione di cellule neoplastiche.

Perché allora si sono impiegati tanti sforzi per trovare il metodo ideale di quantificare in modo “**statico**” la proliferazione cellulare? Essenzialmente per due ordini di ragioni:

1. l'indice proliferativo può essere un indicatore prognostico, vista la sua potenziale interrelazione con i marcatori genomici (alterazioni oncogeniche = aumento proliferativo)
2. elevati livelli proliferativi possono identificare pazienti meritevoli di approcci terapeutici più aggressivi.

Nei capitoli che seguono vedremo in che modo queste due affermazioni possono applicarsi ai TCC.

RICHIAMI SUL CICLO CELLULARE

Il ciclo cellulare si compone di diverse fasi, ciascuna correlata a precisi eventi e cambiamenti molecolari. La **fase G1** (“gap 1”) è il periodo intercorrente tra la fine della mitosi (**M**) e l'inizio della sintesi di DNA (**fase S**). Al termine di quest'ultima, le cellule entrano in una seconda **fase** “gap” (**G2**) che durerà sino all'inizio della mitosi successiva. Il tempo intercorrente tra due mitosi (tempo di durata del ciclo cellulare) può essere estremamente variabile a seconda della durata della fase G1. È opinione comune

che l'inizio della fase G1 rappresenti un punto cruciale (punto di restrizione) nel controllo del ciclo cellulare. Alle cellule che vi giungono si aprono 3 strade: 1. Ripetere il ciclo cellulare; 2. Uscire dal ciclo cellulare ed entrare in una fase di quiescenza detta **fase G0**, dalla quale possono venire nuovamente ripescate sotto opportuni stimoli per intraprendere ulteriori divisioni cellulari; 3. Uscire dal ciclo cellulare in modo permanente al fine di intraprendere un processo di differenziazione terminale (ed eventualmente di morte cellulare). Le cellule staminali normali (midollo osseo, cellule basali dell'epidermide, ecc...) e le cellule tumorali in genere intraprendono la prima strada. Le cellule muscolari e nervose hanno intrapreso la terza possibilita' per diventare popolazioni cellulari statiche in modo permanente. Infine alcuni tipi cellulari (cellule epatiche, prostatiche e della tiroide) si trovano in fase G0 e possono essere reinserite nel compartimento proliferativo sotto opportuni stimoli.

In una popolazione cellulare normale dotata di attivita' proliferativa (ad esempio le cellule delle cripte intestinali oppure anche le cellule uroteliali basali) come pure in un tumore, nel momento in cui ci apprestiamo a "fotografare" lo stato proliferativo, solo una parte piu' o meno variabile di cellule si trovera' nel ciclo cellulare. Il risultato che otterremo dal conteggio delle cellule proliferanti costituirà **l'indice proliferativo (IP)** e sarà espresso come segue:

$$IP = N_p / N_p + N_q$$

Dove N_p = numero di cellule proliferanti ed N_q = numero di cellule quiescenti (in fase G0). Rarissimamente, neanche nei tumori piu' sdifferenziati, l'indice proliferativo arrivera' ad essere il 100% (Alison M., Sarraf C., 1997; Young S., 1992).

CLASSIFICAZIONE DEI METODI DI DETERMINAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

Esistono diverse possibilita' di classificazione delle metodiche di studio della proliferazione. Un primo modo tiene conto della fase del ciclo cellulare indagata, distinguendo le metodiche specifiche per una sola fase (% di fase S, timidina triziata e

BrdUrd per la fase S; indice mitotico per la mitosi) da quelle in grado di individuare le cellule proliferanti in quasi tutte le fasi cicliche (PCNA e Ki67).

Altro criterio e' quello di una classificazione in base all'utilita' delle metodiche, dal momento che alcune di esse, quali l'indice di timidina triziata e la BrdUrd sono scarsamente praticabili per la necessita' di somministrazione in vivo dei marcatori. Per ragioni di praticita' distingueremo i vari indici proliferativi in base alla tecnica di laboratorio utilizzata per la determinazione, e precisamente in marcatori proliferativi non immunoistochimici (cap. 17) e marcatori proliferativi immunoistochimici (cap 18). La **tabella 18** riporta le principali caratteristiche degli indici proliferativi definiti dalle diverse metodiche.

Esistono infine due metodiche che non forniscono un vero e proprio "indice proliferativo" ma sono indirettamente correlate con il grado di proliferazione cellulare. Entrambe si basano sulle caratteristiche morfologiche delle strutture nucleolari (AgNOR) e nucleari (morfometria) delle cellule neoplastiche e verranno trattate in un capitolo a parte (cap. 19).

BIBLIOGRAFIA

Alison M. R., Sarraf C. E. Understanding cancer. Cambridge University Press. 1997.

Young S. Dangerous dance of the dividing cell. New Scientist 1992; 1824: 23-27.

CAP. 17: MARCATORI PROLIFERATIVI NON IMMUNOISTOCHEMICI NEI TCC

PERCENTUALE DI FASE S CITOFUSSIMETRICA

Le caratteristiche generali ed il valore prognostico di questo indice proliferativo sono già stati esposti nel capitolo 13 ai quali si rimanda.

INDICE DI TIMIDINA TRIZIATA

Definizione

La timidina è l'unico dei 4 nucleosidi che si ritrova specificamente nel DNA e non nell'RNA. Per questo motivo la timidina marcata radioattivamente con trizio (³H-timidina) è stata per molti anni largamente utilizzata negli studi sulla proliferazione cellulare. L'indice di marcatura per la timidina (TLI% = thymidine labelling index) è costituito dalla percentuale di cellule nella fase S del ciclo e viene misurato normalmente un'ora dopo l'esposizione dei tessuti alla timidina.

Limiti della metodica

L'impiego di questa tecnica sull'uomo è andato declinando molto a motivo delle rilevanti problematiche etiche derivanti dall'utilizzo di una sostanza radioattiva che, dovendo essere incorporata nelle cellule proliferanti, richiede una somministrazione in vivo. Il limite della metodica, quand'anche applicata su modelli animali, è rappresentato dai costi e dalla necessità di possedere un'apparecchiatura per lo sviluppo autoradiografico. La misurazione dell'incorporamento di timidina marcata con C¹¹ può costituire un'alternativa valida per i costi più ridotti e per la corta emivita dell'isotopo (Steel G.G., 1993).

Utilizzo dell'indice di timidina triziata nei TCC

L'incorporazione di timidina triziata è stata utilizzata inizialmente per studi sulla cinetica proliferativa della mucosa di colon (Wargovich M.J., 1988).

Nei carcinomi vescicali, l'indice di marcatura medio è risultato essere marcatamente più elevato che nell'epitelio vescicale normale. Una buona correlazione è stata osservata tra

grado istologico di malignita' ed incremento dell' indice proliferativo per la timidina (Dlhos A., 1979).

Gli inconvenienti presentati da questa metodica hanno pero' fatto si' che negli ultimi anni la sua utilizzazione come indice proliferativo nei tumori umani sia caduta completamente in disuso.

CONTEGGIO DELLE MITOSI ED INDICE MITOTICO

Definizione

Il conteggio delle mitosi e' il metodo di determinazione della proliferazione cellulare piu' antico e piu' semplice.

La quantificazione della proliferazione mediante valutazione della fase mitotica del ciclo puo' essere espressa in 3 modi:

1. **Conteggio delle mitosi** o indice di attivita' mitotica (**MAI** = mitotic activity index), che esprime il numero di figure mitotiche identificate in 10 campi microscopici dalle aree a piu' alta densita' cellulare (HPF) del preparato istologico (Lipponen P.K., 1990). Questo metodo non tiene pero' conto del volume cellulare: un HPF di un tumore a cellule grandi conterra' meno cellule di un corrispettivo a piccole cellule.
2. **Indice mitotico % (IM)**, inteso come il valore percentuale di cellule di una data popolazione cellulare che si trova in fase mitotica. Richiede piu' tempo del precedente, ma e' piu' preciso e riproducibile.
3. **Indice mitotico corretto per unita' di volume (M/V index)**, in cui il numero di mitosi presenti in 10 campi ad alta proliferazione cellulare (MAI) viene corretto in base all'area del tessuto neoplastico ad alta densita' cellulare, calcolata simultaneamente al conteggio mitotico. Il numero di mitosi viene cosi' espresso per mm^2 di tessuto neoplastico (Haapasalo H., 1989).

Vantaggi

Il principale vantaggio di questa metodica e' la sua relativa semplicita': il conteggio viene effettuato sullo stesso preparato colorato con ematossilina ed eosina che e' stato allestito per l'attribuzione del grado e dello stadio.

Svantaggi

Innanzitutto la mitosi e' una fase molto ristretta del ciclo cellulare e pertanto non e' infrequente che una data sezione istologica di un tumore risulti avere un indice mitotico uguale a zero. Questo fatto viene accentuato ulteriormente dalle difficolta' nel riconoscere le figure mitotiche in un preparato, particolarmente per un osservatore inesperto (Montironi R., 1988).

Come tutti gli altri parametri proliferativi di stato, l'indice mitotico non dipende solo dalla quota di cellule effettivamente in fase mitotica, ma anche dalla durata della fase stessa. Pertanto l'indice mitotico in un tumore puo' variare enormemente non tanto per un'elevata cinetica proliferativa quanto per un semplice allungamento della fase mitotica (Alison M. R., 1997).

Infine l'impiego dei diversi metodi di conteggio (MAI, IM, M/V, ecc...) rende difficile la standardizzazione della metodica ed il confronto dei risultati tra i vari autori (Baak J.P.A., 1990).

Utilita' prognostica dei vari indici mitotici nei TCC

Finora gli indici mitotici riportati per i diversi istotipi tumorali hanno dimostrato piu' o meno tutti una certa utilita' prognostica.

Per quanto concerne i carcinomi transizionali, molti investigatori hanno ottenuto informazioni prognostiche valide utilizzando semplicemente il conteggio mitotico (MAI) (Helander K.G., 1986; Cohen M.B., 1993; Lipponen P.K., 1993a).

Cohen e coll. (1993) hanno riscontrato una forte correlazione tra numero di mitosi e tempo della prima recidiva, invasione muscolare e sopravvivenza. Associando il volume nucleare (vedi il capitolo 19) e la frequenza mitotica, Carbin (1990) e' riuscito a distinguere TCC vescicali di grado 2 in due gruppi con una sopravvivenza a 5 anni del 92% e 43% rispettivamente.

L'indice mitotico corretto per volume (indice M/V) e' stato utilizzato sui carcinomi vescicali da Lipponen (1991), salutato come un parametro che minimizza la variabilita' connessa all'osservatore.

Benche' sia il MAI che il M/V correlino in modo significativo con il tempo libero da recidiva e la sopravvivenza, all'analisi multivariata il M/V e' risultato essere piu' efficace nel predire progressione e sopravvivenza. Il rischio di progressione in presenza di un indice M/V < di 3 e' del 10% contro un 60% quando lo stesso indice e' > di 3. Gli autori

concludono pertanto che il M/V dovrebbe sostituire il MAI nella pratica clinica (Lipponen P.K., 1990). Questi incoraggianti risultati vengono confermati dallo stesso gruppo su una casistica di 537 TCC vescicali, dove il M/V e' in grado di predire la progressione degli stadi Ta/T1 in modo indipendente (Lipponen P.K., 1992).

In una coorte di 148 TCC superficiali (stadi Ta e T1), l'indice M/V e la fase S sono risultati predittori indipendenti di progressione contrariamente alla morfometria nucleare ed alla ploidia (Lipponen P.K., 1993b).

L'indice M/V e' risultato essere correlato ai vari gradi e stadi patologici di 207 TCC vescicali superficiali con una significativita' sovrapponibile al Ki67 (Liukkonen T.J., 1996). L'utilizzo dell'indice M/V sembra quindi rivestire un indubbio valore prognostico nei TCC, anche se gli unici dati disponibili al momento attuale provengono quasi esclusivamente dallo stesso gruppo di ricerca. Un giudizio definitivo sulla riproducibilita' della metodica e dei risultati per ora incoraggianti necessitano pertanto la conferma da parte di ulteriori studi.

BIBLIOGRAFIA

Alison M. R., Sarraf C. E. Understanding cancer. Cambridge University Press. 1997.

Baak J.P.A. Mitosis counting in tumors. Hum Pathol 1990; 7: 683-685.

Carbin B.E. Prognostic factors in urinary bladder cancers. Thesis. Stockholm, 1990.

Cohen M.B. et al. Comparison of five histopathologic methods to assess cellular proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Hum Pathol 1993; 24: 772-778.

Dlhos A. et al. In-vitro-technique for autoradiographic investigations of cell proliferation in benign and malignant alterations of the human urinary bladder mucosa from biopsy specimens. Urologe-A 1979; 18 (2): 112-114.

Haaapasalo H., Collan Y., Pesonen E. Volume corrected mitotic index (M/V index): the standard of mitotic activity in neoplasms. *Pathol Res Pract* 1989; 185: 551-554.

Helander K.G. Karyometric investigations on urinary bladder carcinoma including histotechnological studies with special reference to nuclear morphology. Thesis. Umea, 1986.

Lipponen P.K., Eskelinen M.J. Volume-corrected mitotic index and mitotic activity index in transitional cell bladder cancer. *Eur Urol* 1990; 18: 258-262.

Lipponen P.K., Eskelinen M.J. How to count mitoses in bladder cancer? *Anticancer Res* 1991; 11 (2): 825-829.

Lipponen P.K. et al. Independent clinical, histological and quantitative prognostic factors in transitional-cell bladder tumors, with special reference to mitotic frequency. *Int J Cancer* 1992; 51 (3): 396-403.

Lipponen P.K. et al. Grading of superficial bladder cancer by quantitative mitotic frequency analysis. *J Urol* 1993a; 149: 36-41.

Lipponen P.K. et al. Proliferation indices as independent prognostic factors in papillary Ta-T1 transitional cell bladder tumours. *Br J Urol* 1993; 72 (4): 451-457.

Liukkonen T.J. et al. Expression of MIB-1, mitotic index and S-phase fraction as indicators of cell proliferation in superficial bladder cancer. *Urol Res* 1996; 24 (1): 61-66.

Montironi R. et al. Reproducibility of mitotic counts and identification of mitotic figures in malignant glial tumors. *Appl Pathol* 1988; 6: 258-265.

Steel G.G. The growth rate of tumors. In *Basic Clinical Radiobiology*, ed. G.G. Steel 1993; pp. 8-13. London: Edward Arnold.

Wargovich M.J. and Hu P.J. An improved method for determination of colonic mucosal proliferation: uptake of tritiated thymidine under hyperbaric oxygen conditions. *Cancer Lett* 1988; 42 (3): 207-212.

CAP. 18: MARCATORI PROLIFERATIVI IMMUNOISTOCHEMICI NEI TCC

INTRODUZIONE

Le tecniche che andremo illustrando (BrdUrd, PCNA e Ki67) condividono tutte la stessa metodica di determinazione, e precisamente l'indagine immunocistochimica mediante utilizzo di anticorpi monoclonali specifici per una particolare sostanza esogena incorporata in vivo da cellule proliferanti (BrdUrd) oppure per degli antigeni espressi nel nucleo cellulare durante le varie fasi del ciclo cellulare (PCNA e Ki67). Per la descrizione della tecnica di laboratorio si rimanda al capitolo 4.

In generale, in queste metodiche, e' il nucleo cellulare ad essere "marcato" dalla reazione istochimica e pertanto si rendera' necessario determinare il numero di nuclei positivi in relazione ad un certo numero di cellule del preparato. Il risultato, espresso come percentuale di cellule positive alla reazione, definira' l'indice proliferativo per un dato marcatore. E' opportuno contare con una certa esattezza la quantita' totale di cellule neoplastiche nel campo microscopico, evitando la tentazione di determinare soltanto il numero di "eventi" per "campo ad alta cellularita'" (HPF), poiche' in quest'ultimo modo non si terrebbe conto ne' della variabilita' del volume cellulare ne' della eterogeneita' del tessuto (presenza di altri tipi cellulari non neoplastici) (Hall P.A., 1992).

Recentemente alcuni gruppi di lavoro hanno sperimentato con successo l'applicazione di analizzatori computerizzati di immagini. Uno di questi programmi, utilizzando la scala dei grigi e l'area nucleare di positivitaa alla reazione, ha dimostrato risultati sovrapponibili all'analisi visiva nell'attribuzione dell'indice proliferativo sia per la BrdUrd che per la PCNA in tumori vescicali (Weaver J.R., 1997). Il vantaggio e' costituito, oltre che dal risparmio di tempo, anche dalla riduzione della variabilita' inter- ed intra- osservatore.

ANTICORPI CONTRO LA 5-BROMODESOSSIURIDINA (BRDURD)

Definizione

La BrdUrd e' un analogo non radioattivo della timidina e pertanto viene incorporato nel DNA delle cellule proliferanti durante la fase S del ciclo (Szyblaski W., 1974). E' stato il primo marcatore proliferativo ad essere identificato dopo la timidina triziata.

Metodica

I primi studi vennero condotti con somministrazione in vivo della bromodesossitimidina, sviluppando poi la reazione con anticorpi anti-BrdUrd marcati con fluorescina. A fare di questa tecnica uno strumento di agevole applicazione clinica e' stata la constatazione che preparati di tessuto tumorale fresco, messi ad incubare per un'ora in presenza di alte tensioni di ossigeno, incorporavano la BrdUrd. La reazione poteva quindi essere sviluppata con il metodo immunocitochimico classico sia su criopreparati che su materiale incluso in paraffina utilizzando anticorpi monoclonali anti BrdUrd (Gratzner H. G., 1982).

BrdUrd nei TCC vescicali

In uno studio di Tsujihashi, l'indice proliferativo medio per la BrdUrd di 57 TCC vescicali e' risultato essere del 13% contro il 4,1% nell'urotelio normale. La positivita' e' risultata correlarsi significativamente con il grado di differenziazione, con lo stadio, con il volume tumorale e con l'indice proliferativo definito dal Ki67 (Tsujihashi H., 1991).

Popert (1993) oltre a confermare la buona correlazione della positivita' per la BrdUrd con lo stadio, fa notare come l'indice proliferativo dei tumori recidivi sia significativamente piu' elevato rispetto alle forme non recidivanti. Si tratta pero' solo di uno studio pilota, su 19 casi e non stratificato per categorie prognostiche. La validita' dell'incorporazione di BrdUrd come indice proliferativo viene confermata da due ulteriori studi in cui si mette in evidenza una forte correlazione con l'espressione di PCNA in 66 tumori vescicali (Waldman F.M., 1993) e con il Ki67 (Cohen M.B., 1993).

A dispetto di questi buoni risultati iniziali non risulta siano stati pubblicati, neanche recentemente, lavori che indaghino il valore prognostico di questo indice proliferativo.

ANTIGENE NUCLEARE DELLE CELLULE PROLIFERANTI (PCNA)

Definizione

E' una proteina non istonica di 36 Kda, indispensabile per la sintesi e la riparazione del DNA. Le cellule non possono dividersi in sua assenza in quanto e' una proteina ausiliaria della DNA polimerasi δ . Elevati livelli di PCNA appaiono nel nucleo nella tarda fase G1, raggiungono i livelli massimi nella fase S per poi declinare nella fase G2 ed M (Bravo R., 1987).

Metodica

Anticorpi anti-PCNA furono isolati per la prima volta da autoanticorpi umani anti-nucleo di soggetti affetti da lupus eritematosus. Diversi anticorpi, specifici per differenti epitopi antigenici, sono stati successivamente prodotti. Quello correntemente utilizzato per la determinazione immunohistochimica dell'indice proliferativo per la PCNA e' il PC-10

Vantaggi

Fu il primo antigene proliferativo a poter essere determinato immunohistochimicamente su preparati inclusi in paraffina quando la reazione per il Ki67 era possibile solo su sezioni tissutali congelate. L'espressione antigenica si estende pressoché a tutte le fasi del ciclo cellulare, consentendo in teoria l'identificazione di tutte le cellule impegnate nel ciclo cellulare.

Svantaggi

Alcune considerazioni devono indurre ad interpretare l'indice proliferativo con una certa cautela. L'emivita della proteina e' alquanto lunga (piu' di 20 ore), per cui e' possibile che risultino marcate cellule che hanno gia' ultimato il ciclo cellulare. All'opposto, l'antigene puo' andare facilmente distrutto dopo una fissazione che si prolunghi dopo le 48 ore (Hall P.A., 1990).

Valore prognostico nei TCC

Nella **tabella 19** sono riportati gli studi piu' recenti di una fiorente letteratura sorta attorno a questo indice proliferativo negli uroteliomi. Il motivo e' facilmente comprensibile visto l'unanime consenso sulla validita' prognostica di questo marcatore. In 60 tumori vescicali superficiali, Pantazopoulos e coll. (1997) non hanno riscontrato alcuna recidiva in presenza di status diploide e di una espressione per la PCNA < del 30%.

L'indice proliferativo per la PCNA si e' dimostrato in alcuni studi piu' affidabile di marcatori oncogenici estesamente indagati nella vescica, quali la p53 (Inagaki T., 1997).

Rimane tuttora da definirsi un valore di cut-off da applicarsi nella pratica clinica. La **tabella 19** mostra le notevoli discrepanze emerse tra i vari autori su questo punto, probabilmente a motivo dell'estrema variabilità di risultati prodotti nei diversi centri per problemi inerenti la tecnica immunostochimica o l'interpretazione dei risultati.

ANTICORPO MONOCLONALE KI67

Definizione

E' un anticorpo murino della classe delle IgG, così nominato per essere stato per la prima volta isolato a Kiel dalla 67° pozza di una cultura cellulare contenente come antigene una frazione nucleare di cellule linfomatose (Gerdes J., 1983).

Antigene

Questo anticorpo riconosce un antigene (composto da un complesso di due polipeptidi rispettivamente di 345 e 395 Kda) associato con il nucleo cellulare. L'antigene è espresso in tutte le fasi del ciclo cellulare, eccetto la G0 (Schwartz R., 1986). L'espressione antigenica aumenta durante la seconda parte della fase S e raggiunge un picco nelle fasi G2 ed M (Sasaki K., 1987).

La funzione di questo complesso proteico non è conosciuta, anche se è stato proposto che possa agire come una molecola "timer" intimamente coinvolta nel controllo del ciclo cellulare (Cooper S., 1982).

Anticorpo

Per molto tempo la reazione anticorpale per il Ki67 ha sofferto di un significativo inconveniente: l'estrema labilità dell'antigene nel corso dell'approntamento dei preparati inclusi in paraffina. Questo fatto ha limitato gli studi ai criopreparati sino al 1993, quando è stato prodotto un nuovo anticorpo, denominato MIB-1, specifico per porzioni più centrali ed altamente ripetute dell'antigene. La preservazione morfologica di quest'ultimo nei preparati paraffinati è addirittura superiore alle sezioni congelate.

Vantaggi

Dal punto di vista teorico il Ki67 può essere considerato, come del resto la PCNA, un marcatore proliferativo ideale. Essendo espresso in tutte le fasi del ciclo cellulare, consente una stima accurata dell'indice proliferativo. In più, contrariamente alla PCNA,

l'elevata stabilita' dell'antigene specifico per il MIB-1 permette l'effettuazione di studi retrospettivi anche su preparati di vecchia data.

Valore prognostico del Ki67 nei TCC

L'ottima correlazione dell'indice proliferativo per il Ki67 (ottenuto dal rapporto tra il numero di nuclei positivi alla reazione su una media di circa 1000 cellule della sezione) con i tradizionali fattori prognostici dei tumori uroteliali e' emersa sin dai primi studi effettuati sui criopreparati. La mucosa uroteliale normale mostra un'immunoreattivita' estremamente ridotta, confinata a sporadiche cellule basali (Tsujihashi H., 1991), con un indice proliferativo variabile da 0 a 0,76% (Okamura K., 1990). La proporzione di cellule positive nei tumori invasivi (12%) e' significativamente superiore a quella dei tumori superficiali (4%) e lo stesso rapporto si riscontra nei tumori scarsamente differenziati rispetto a quelli moderatamente o ben differenziati (Mellon K., 1990). Altri autori riferiscono una positività che cresce in modo significativo con il grado di differenziazione e con lo stadio (Bush C., 1991). Okamura (1990) riporta un indice proliferativo significativamente superiore nei T1 rispetto ai Ta.

Gli studi condotti utilizzando l'anticorpo MIB-1 su preparati inclusi in paraffina hanno sostanzialmente confermato l'intima correlazione tra indice proliferativo ed il grado/stadio della malattia (**Fotografia 3**). Come illustrato nella **tabella 20**, il Ki67 sembra inoltre fornire un valido ausilio nel predire il comportamento delle neoplasie vescicali, particolarmente di quelle superficiali. La disomogenea distribuzione della positività nucleare nei gradi II permette di distinguere 2 sottogruppi di tumori: da una parte quelli con proliferazione della sola porzione vegetativa, con scarsa tendenza alla recidiva; dall'altra quelli con indice proliferativo espresso in tutto il tumore o solo nella sua base d'impianto, in cui la tendenza alla recidiva si approssima al 100% (Fontana, 1992).

Se un valore di Ki67 > del 5% seleziona i tumori TaG1 recidivanti (Tizzani, 1994), un cut-off di indice proliferativo attorno al 30% discrimina le forme tumorali con tendenza alla progressione e con ridotta sopravvivenza (Popov, 1997; Tsuji, 1997). Su una nostra casistica di 187 TCC vescicali di stadio Ta-T1/G1-G2, un valore di indice per il Ki67 del 20% e' risultato discriminare in modo significativo la tendenza alla recidiva (dati non

pubblicati). Siu e coll. (1998) non hanno riportato invece alcun valore prognostico del Ki67 come marcatore di prognosi nei tumori vescicali infiltranti.

Correlazione del Ki67 con altri marcatori nei TCC

L'indice proliferativo per il Ki67 si correla molto bene con l'indice per la BrdUrd (Limas C., 1993). Dal momento che la BrdUrd e' un marcatore della fase S, l'indice di positivita' per il Ki67 sara' di gran lunga superiore, in accordo con la nota espressione dell'antigene in tutte le fasi del ciclo cellulare.

I valori medi di Ki67 sono circa il doppio nei tumori p53 positivi e RB negativi rispetto a quelli p53 negativi e RB positivi (Wright C., 1995), ad indicare l'intima correlazione tra perdita della funzione oncosoppressiva ed incremento proliferativo.

QUALE MARCATORE PROLIFERATIVO UTILIZZARE NELLA PRATICA CLINICA?

In un interessante studio su 58 tumori vescicali Kruger e coll. (1995) hanno correlato il parametro morfometrico dell'area nucleare media, il conteggio delle regioni di organizzazione nucleolare (NORs) (vedi capitolo 18), la PCNA ed il Ki67 con il grado e lo stadio della neoplasia. L'indice per il Ki67 e' sembrato essere il parametro piu' adatto nel discriminare tra le forme infiltranti e non.

L'indice per la BrdUrd presenta l'inconveniente tecnico dell'incubazione di tessuto fresco per un'ora. La % di fase S necessita dell'apparechiatura citoflussimetrica ed in piu' puo' essere calcolata in non piu' del 90% dei casi.

L'indice mitotico rappresenta una fase troppo ristretta del ciclo cellulare e come tale fornisce un'indicazione approssimativa sullo stato proliferativo. Diversi studi ne hanno sottolineato l'importanza prognostica sebbene non vi sia ancora un accordo sul modo con cui calcolare l'indice proliferativo.

L'indice per la PCNA, a dispetto della sua espressione in tutte le fasi del ciclo cellulare, non e' sempre affidabile a causa dell'instabilita' dell'antigene durante la fissazione.

Il Ki67 e' sicuramente l'indice proliferativo che presenta i maggiori vantaggi sia in termini di utilita' prognostica che di semplicita' ed accuratezza nella metodica di determinazione. Ulteriori studi si rendono necessari per confermare l'attendibilita' dei

valori di cut-off di questo marcatore che pare essere al momento attuale uno tra i pochi strumenti da utilizzarsi quale ausilio ai fattori prognostici tradizionali nel management clinico dei TCC.

BIBLIOGRAFIA

Bravo R. et al. Cyclin/PCNA is the auxillary protein to DNA polymerase-delta. Nature 1987; 326: 515-520.

Bush C. et al. Proliferation in human bladder carcinoma measured by Ki67 antibody labelling: its potential clinical importance. Br J Cancer 1991; 64: 357-360.

Chen G., Lin M.S., Li R.C. Expression and prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Urol Res 1997; 25: 25-30.

Cheng H.L. et al. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. Anticancer Res 1997; 17 (4A): 2789-2793.

Cohen M.B. et a. Comparison of five histopatologic methods to assess cellular proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Hum Pathol 1993; 24 (7): 772-778.

Cooper S. The continuum model: application to G1-arrest and G0. In: Nicolini C ed. Cell Growth: NATO Advanced Study Series A. Life sciences New York: Plenum Press. 1982; 38: 315-336.

Fontana D. et al. Monoclonal antibody Ki-67 in the study of the proliferative activity of bladder carcinoma. J Urol 1992; 148: 1149-1151.

Gerdes J. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20.

Gratzner H.G. Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iodo-deoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982; 218: 474-475.

Hall P.A. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalisation in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of de-regulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162: 285-294.

Hall P.A., Levison D.A. and Wright N.A. Assessment of cell proliferation in clinical practise. London: Springer-Verlag. 1992.

Hattori K. et al. Proliferating cell nuclear antigen cyclin in human transitional cell carcinoma. *Br J Urol* 1995; 75: 162-166.

Inagaki T. et al. PCNA and p53 in urinary bladder cancer: correlation with histological findings and prognosis. *Int J Urol* 1997; 4 (2): 172-177.

Kruger S. and Muller H. Correlation of morphometry, nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 antigen expression with grading and staging in urinary bladder carcinomas. *Br J Urol* 1995; 75: 480-484.

Limas C. et al. Proliferative activity of urothelial neoplasms: comparison of BrdU incorporation, Ki67 expression, and nucleolar organizer regions. *J Clin Pathol* 1993; 46: 159-165.

Lipponen P.K. and Eskelinen M.J. Cell proliferation of transitional cell bladder tumors determined by PCNA/cyclin immunostaining and its prognostic value. *Br J Cancer* 1992; 66: 171-176.

Mellon K. et al. Cell cycling in bladder carcinoma determined by monoclonal antibody Ki67. *Br J Urol* 1990; 66: 281-285.

Okamura K. et al. Growth fractions of transitional cell carcinomas of the bladder defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Urol* 1990; 144: 875-878.

Pantazopoulos D. et al. DNA content and proliferation activity in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Anticancer Res* 1997; 17 (1B): 781-786.

Popert R.J.M. et al. Bromodeoxyuridine labelling of transitional cell carcinoma of the bladder – an index of recurrence? *Br J Urol* 1993; 71: 279-283.

Popov Z. et al. The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 1997; 80 (8): 1472-1481.

Sasaki K. et al. The cell cycle associated change of the Ki67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol* 1987; 133: 579-584.

Schwartz R. et al. Determination of the growth fraction in cell suspensions by flow cytometry using the monoclonal antigen Ki67. *J Immunol Methods* 1986; 90: 65-70.

Siu L.L. et al. The prognostic role of p53, metallothionein, P-glycoprotein and MIB-1 in muscle-invasive urothelial transitional cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4 (3): 559-565.

Stavropoulos N.E. et al. Growth fractions in bladder cancer defined by Ki67: association with cancer grade, category and recurrence rate of superficial lesions. *Br J Urol* 1993; 72: 736-739.

Szyblaski W. X-ray sensitization by halopyromidines. *Cancer Chemother Rep* 1974; 58: 539-543.

Tizzani A. et al. Ki67 immunohistochemistry in recurrent grade I transitional cell carcinoma of the bladder. *Acta Urol Ital* 1994; 6: 299-301.

Tsuji M. et al. Prognostic value of Ki-67 antigen and p53 protein in urinary bladder cancer: immunohistochemical analysis of radical cystectomy specimens. *Br J urol* 1997; 79: 367-372.

Tsujihashi H. et al. Cell proliferation of human bladder tumors determined by BrdUrd and Ki67 immunostaining. *J Urol* 1991; 145: 846-849.

Waldman F.M. et al. %-bromodeoxyuridine incorporation and PCNA expression as measures of cell proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Mod Pathol* 1993; 6 (1): 20-24.

Weaver J.R. and Au J.L. Comparative scoring by visual and image analysis of cells in human solid tumors labeled for proliferation markers. *Cytometry* 1997; 27 (2): 189-199.

Wright C. et al. Expression of retinoblastoma gene product and p53 protein in bladder carcinoma: correlation with Ki67 index. *Br J Urol* 1995; 75 (2): 173-179.

CAP. 19 VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE ATTRAVERSO PARAMETRI MORFOLOGICI

STUDIO DELLE REGIONI DI ORGANIZZAZIONE NUCLEOLARE (NORS)

Premessa

L'osservazione che le cellule neoplastiche erano caratterizzate dalla presenza di nucleoli larghi ed irregolari ha indotto ad approfondire le ricerche sulla funzione di queste strutture nucleari. Una serie di studi condotti al microscopio elettronico aveva dimostrato che i cambiamenti nucleolari potevano costituire importanti parametri citopatologici per la diagnosi di neoplasie maligne (Busch and Smetana, 1970).

Struttura del nucleolo

Il nucleolo di una cellula umana in crescita contiene i geni che codificano per l'RNA ribosomiale (rRNA) e numerose proteine (proteine istoniche e non istoniche, proteine ribosomiali ed enzimi deputati al controllo della trascrizione dei geni per l'rRNA).

Il nucleolo e' una unita' strutturale-funzionale ben definita nel nucleo delle cellule in interfase, periodo in cui si verifica appunto la sintesi dell' rRNA. Al microscopio elettronico esso risulta formato da tre componenti principali: 1) i centri fibrillari, strutture rotondeggianti e leggermente eltrondense; 2) i componenti fibrillari densi, strutture piu' eltrondense che circondano i centri fibrillari ed infine 3) i componenti granulari.

Le strutture di organizzazione nucleolare

La forma ed il volume di un nucleolo sono estremamente variabili a seconda dell'attivita' cellulare. Nelle cellule non proliferanti il nucleolo e' di solito molto piccolo e con una struttura alquanto semplice. Quando una cellula viene stimolata a proliferare, il nucleolo si espande e la sua struttura fibrillare si fa piu' intricata ed in particolare aumenta il numero di centri fibrillari. Questi cambiamenti costituiscono le strutture di organizzazione nucleolare e sono facilmente evidenziabili solo in microscopia elettronica. Alla misurazione del volume e del numero di centri fibrillari e' stata attribuita una

correlazione con lo stato proliferativo e quindi con la prognosi di cellule tumorali (Crocker J.,1990).

AgNOR: una metodica semplice per lo studio dei NORs

Lo studio dei nucleoli al microscopio elettronico e' troppo indaginoso per essere applicato nella pratica clinica. Nel 1986 Ploton, sfruttando l'elevata affinita' dei NOR per l'argento precedentemente osservata da Howell nel 1982, ha elaborato un metodo semplice per cui i centri fibrillari e le componenti fibrillari dense possono essere "colorati" con argento. Questa tecnica, denominata AgNOR, rende visibile al microscopio ottico la struttura di un nucleolo come un insieme di tanti granellini neri, ben distinguibili e pertanto contabili, che rappresentano appunto i centri fibrillari.

Il primo metodo applicato dagli istopatologi per quantificare gli AgNOR nella routine istopatologica e' stato quello di contare il numero di "punti neri" per cellula con il microscopio ottico a 1000 X (Crocker J., 1989). Sebbene questo sistema, tuttora valido, si sia dimostrato utile dal punto di vista prognostico, e' alquanto soggettivo e richiede molto tempo. Nel tentativo di superare questi svantaggi, alcuni gruppi hanno sviluppato sistemi di valutazione automatica dell'area delle strutture colorate con argento (Derenzini M., 1991).

Valore prognostico degli AgNOR nei TCC

Abbiamo poc'anzi ricordato come i NORs riflettano l'attivita' trascrizionale dei geni per l'rRNA e pertanto giochino un ruolo importante nella sintesi proteica. Il numero di AgNOR per nucleo esprime l'attivita' cellulare e verosimilmente anche la proliferazione (Ploton D., 1986). La buona correlazione lineare tra espressione di PCNA ed AgNOR nei carcinomi vescicali riscontrata da Skopelitou e coll. (1992) ne e' una riprova. Questi autori hanno parimenti osservato un significativo incremento del numero di AgNOR soprattutto tra i gradi II e III e tra i diversi stadi patologici. Secondo Marandola e coll. (1992) l'indice di AgNOR (numero di AgNOR per nucleo cellulare) puo' essere assunto come un valido marcatore di progressione come osservato in uno studio su 38 TCC vescicali.

Dopo uno studio preliminare che correlava il numero di AgNOR con la prognosi dei TCC (Lipponen P.K., 1991), Lipponen (1993) ha preso in considerazione altri parametri quali l'area media di ciascun AgNOR calcolata mediante un analizzatore di immagini e l'area nucleare media (ottenuta moltiplicando l'area media di ciascun AgNOR per il numero di AgNOR presenti in un dato nucleo. Contrariamente all'area media degli AgNOR, che non ha mostrato alcuna utilità, l'area nucleare media si è rivelata un valido marcatore di progressione e di sopravvivenza.

Recentemente Masuda (1997) ha confermato la buona correlazione dell'indice di AgNOR con i parametri prognostici di 90 TCC vescicali, puntualizzandone la validità come fattore predittivo in modo indipendente di recidiva.

CENNI SUGLI STUDI DI MORFOMETRIA

Premessa

La valutazione di parametri relativamente semplici quali l'area media del nucleo, l'orientamento dell'asse medio nucleare possono essere molto utili non solo per l'attribuzione del grading, ma anche per una valutazione prognostica di un tumore (Baak J.P.A., 1985).

L'analisi morfometrica fu introdotta per la prima volta da Kern (1975) per migliorare l'assegnazione del grading sui campioni citologici urinari. Egli riscontrò che la grandezza media dei nuclei, il numero di nucleoli e l'accumulo di aggregati cromatinici di varie dimensioni all'interno dei nuclei correlavano con il grado tumorale.

Parametri morfometrici

La metodica morfometrica richiede l'utilizzo di sistemi computerizzati per l'analisi delle immagini e la misurazione di diversi parametri. L'elevato numero di caratteristiche nucleari sinora identificate unitamente all'utilizzo di diversi sistemi di elaborazione delle immagini, rende questa tecnica d'indagine difficile da standardizzare.

Dall'analisi dei principali studi condotti sui TCC (Blomjous E.C.M., 1989; Lipponen P.K., 1990a; Borland R.N., 1993), si evince che i parametri più frequentemente presi in considerazione sono:

- L'area nucleare media
- La deviazione standard media dell'area nucleare
- Il volume nucleare medio
- Il fattore di rotondezza nucleare

Altri autori (Colombel M., 1995) preferiscono considerare 15 parametri relativi alla "tessitura" nucleare (in particolare il contrasto assunto dalla cromatina colorata con Fuelgen), identificabili mediante un apposito sistema computerizzato descritto da Koss (1987).

Valore prognostico della morfometria nei TCC

Inizialmente la morfometria nei carcinomi vescicali e' stata adottata quale tecnica ausiliaria per l'attribuzione del grading istologico nei campioni citologici urinari. L'analisi computerizzata delle caratteristiche del nucleo si e' infatti dimostrata subito superiore rispetto alla microscopia ottica (Sherman A.B., 1986) permettendo una piu' accurata differenziazione tra i gradi I e II (Ooms E.C., 1982). La constatazione che il volume nucleare aumentava con la progressione del grado (Blomjous C.E.M., 1989), ha stimolato ulteriori indagini sul possibile valore prognostico dei metodi morfometrici.

La maggior parte dei ricercatori ha indagato le caratteristiche nucleari piu' semplici quali l'area nucleare media, che nello studio di Borland (1993) e' risultata un parametro indipendente di recidiva dopo cistectomia in 14 TCC infiltranti.

Secondo Lipponen (1990a), non solo l'area nucleare media, ma anche la deviazione standard media dell'area nucleare e l'area media dei 10 nuclei di diametro maggiore (Lipponen P.K., 1990b) possono essere validi marcatori di recidiva e progressione.

Il volume nucleare medio di 111 pazienti con carcinoma vescicale e' risultato significativamente ridotto quando la PCNA e' < del 28% rispetto a valori di PCNA superiori, ad indicare che i caratteri morfometrici riflettono in un certo modo le potenzialita' proliferative delle cellule neoplastiche vescicali (Ogura K., 1997).

Sei su 15 parametri che definiscono la "tessitura" nucleare hanno mostrato un buon valore prognostico in diversi studi che hanno adottato lo stesso sistema di indagini (Koss L.G., 1978; Colombel M., 1995).

CONCLUSIONI

Morfometria ed AgNOR sono entrambe due metodiche d'indagine delle caratteristiche morfologiche nucleari. La seconda, piu' soggettiva quando il conteggio viene effettuato manualmente, e' comunque ad oggi la piu' standardizzata e la sua validita' prognostica non e' stata messa in discussione da nessuno degli studi citati.

Da 20 anni a questa parte gli studi di morfometria hanno gareggiato nella ricerca del parametro nucleare ideale. La breve trattazione ora riportata ha lo scopo di mettere in evidenza la complessita' nell'identificazione di una caratteristica nucleare valida e standardizzabile, anche se l'area nucleare media pare essere finora la piu' promettente.

Per questo motivo, a dispetto dei buoni risultati, e' stato difficile fino ad oggi proporre l'adozione di queste tecniche nella routine clinica dei TCC.

BIBLIOGRAFIA

Baak J.P.A. et al. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer* 1985; 56: 374-382.

Blomjous E.C.M. et al. A comparative study in morphometric grading of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Anal Quant Cytol Histol* 1989; 11: 426-432.

Borland R.N. et al. The use of nuclear morphometry in predicting recurrence of transitional cell carcinoma. *J Urol* 1993; 149 (2): 272-275.

Busch H. and Smetana K. Nucleoli of tumor cells. In: Busch H. and Smetana K. (eds), *The Nucleolus*, pp. 448-471. New York: Academic Press. 1970.

Colombel M. Prognostic evaluation of morphonuclear parameters in superficial and invasive bladder cancer. *Br J urol* 1995; 75: 364-369.

Crocker J., Boldy D.A. and Egan M.J. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 1989; 158: 185-188.

Crocker J. Nucleolar organizer regions. *Cur Top Pathol* 1990; 82: 91-149.

Derenzini M. and Trere' B. Standardization of interphase Ag-NOR measurement by means of an automated image analysis system using lymphocytes as an internal control. *J Pathol* 1991; 165: 377-342.

Howell W.M. Selecting staining of nucleolus organizer regions (NORs). In: Busch H. and Rothblum L. (eds), *The cell nucleus*, pp. 89-142. New York: Academic Press. 1982.

Kern W.H. The cytology of transitional cell carcinoma. *Acta Cytol* 1975; 19: 420-448.

Koss L.G. et al. Diagnostic cytologic samples profiles in patients with bladder cancer using TICAS system. *Acta Cytol* 1978; 22: 392-397.

Koss L.G. et al. DNA cytophotometry of voided urinary sediment. Comparison with results of cytologic diagnosis and image analysis. *Anal Quant Cytol Histol* 1987; 9: 398-404.

Lipponen P.K., Eskelinen M.J., Sotarauta M. Prediction of superficial bladder cancer by histoquantitative methods. *Eur J Cancer* 1990a; 26 (10): 1060-1063.

Lipponen P.K., Eskelinen M. Nuclear morphometry in grading transitional cell bladder cancer compared with subjective histological grading. *Anticancer Res* 1990b; 10 (6): 1725-1730.

Lipponen P.K.J., Eskelinen M.J., Nordling S. Nucleolar organiser regions (AgNORs) as predictors in transitional cell bladder cancer. *Br J Cancer* 1991; 64: 1139-1141.

Lipponen P.K. Image analysis of AgNOR proteins in transitional cell bladder cancer. *J Pathol* 1993; 171: 279-283.

Marandola P. et al. A new marker for early detection and indicator of progression of cancer of the bladder. Preliminary results with AgNOR index in 38 cases of superficial bladder cancer. *Eur Urol* 1992; 21 (1): 31-33.

Masuda M. et al. Predictive value of argyrophilic nucleolar-organiser-region-associated proteins in bladder cancer, using cell-imprint preparations. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123 (1): 1-5.

Ogura K. et al. Correlation of nuclear morphometry and immunostaining for p53 and proliferating cell nuclear antigen in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Urol* 1997; 4 (6): 561-566.

Ooms E.C., Kurver P.J.H., Boon M.E. Morphonuclear analysis of urothelial cells in voided urine of patients with low grade and high grade bladder tumors. *J Clin Pathol* 1982; 35: 1063-1065.

Ploton D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochem* 1986; 18: 5-14.

Sherman A.B. et al. Bladder cancer diagnosis by computer image analysis of cells in the sediment of voided urine using a video scanning system. *Anal Quant Cytol Histol* 1986; 8: 177-186.

Skopelitou A. et al. Comparative assessment of proliferating nuclear antigen immunostaining and of nucleolar organizer region staining in transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Eur Urol* 1992; 22: 235-240.

PARTE QUARTA
MARCATORI DELL'APOPTOSI CELLULARE

CAP. 20: I MECCANISMI MOLECOLARI DELL' APOPTOSI

INTRODUZIONE

La morte cellulare e' 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 e' 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 e' un'osservazione non nuova. Gia' da tempo era stato suggerito che l'apoptosi poteva rendere conto della ridotta crescita tumorale rispetto alla cinetica proliferativa del tumore (Kerr J.F.R., 1972). Divenne ben presto evidente come diverse modalita' di trattamento antineoplastico quali gli agenti citotossici, la radioterapia e la deprivazione ormonale avevano la proprieta' di innescare questo processo (Kerr J.F.R., 1994). Come facilmente ipotizzabile pero', in alcune forme neoplastiche questo meccanismo di autoregolazione risultava seriamente compromesso, lasciando cosi' 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 e' cosi' 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 e' 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 24**:

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 e' 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 (Kerr J.F.R., 1994).

Tra l'innesco 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 e' di dimensioni tali da rendersi difficilmente visibile al microscopio ottico (Bursch W., 1990).

DIFFERENZIAZIONE DALLA 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). 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 è "compressa" in un modo finemente ordinato. L'unità fondamentale di questo "impacchettamento" è il nucleosoma, un ottamero istonico che forma una specie di involucro attorno ad una quantità 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 suo multiplo, che migrano elettroforeticamente su gel producendo un tipico aspetto "a scala" (McConkey D.J., 1991).

Un'altra caratteristica comune del processo apoptotico sembra essere l'aumento della concentrazione di Ca^{2+} nel citosol, probabilmente coinvolta 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 (Alison M., 1995).

I meccanismi molecolari alla base di questi eventi non sono ancora stati esattamente definiti. La constatazione che alcune terapie quali agenti chemioterapici e linfociti citotossici innescavano l'apoptosi sulle cellule bersaglio (Hickman J.A., 1992) ha spinto ad ipotizzare l'esistenza di recettori di membrana in grado di attivare o disattivare il fenomeno. La **figura 25** illustra un modello di cascata molecolare che coinvolge il più noto di questi recettori, denominato inizialmente **FAS** e poi in seguito **Apo I** (o CD 95) (Itoh N., 1991). FAS appartiene alla stessa famiglia dell'EGFr ed è espresso praticamente in tutte le cellule in un'unica isoforma (Oehm A., 1992). Il suo ligante invece è espresso solo da poche cellule, tra cui le cellule dotate di attività citotossica oppure si ritrova in circolo come molecola libera.

La catena di reazioni che si svolge a valle del recettore FAS non è ancora interamente compresa. Un punto cruciale sembra essere costituito dall'attivazione di un enzima della famiglia delle cistine-proteasi denominato **ICE** (interleukin- 1β -converting enzyme) per la sua nota funzione di attivare la pro IL- 1β in IL- 1β . ICE è 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'apopaina ne previene la funzione riparatrice clivandone il sito di legame per il DNA, cosi' che il processo apoptotico non viene prevenuto (Alison M., 1997).

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 piu' 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 permeabilita' di membrana, oppure che esistano altre vie biochimiche di trasduzione del segnale al mitocondrio (Kroemer G., 1995).

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 e' una conferma (Kerr J.F.R., 1991994). La crescita di un tumore e con essa l'immortalizzazione dei cloni neoplastici saranno espressione diretta sia di un incremento proliferativo che dell'incepimento del meccanismo di morte cellulare.

L'apoptosi può riscontrarsi virtualmente in tutti le neoplasie maligne (Harmon B.V., 1987). 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. Alcuni di questi sono già stati trattati precedentemente poiché svolgono nel contempo un ruolo attivo nel controllo della proliferazione (p53, c-myc). I geni che ora andiamo trattando sono invece noti per il loro specifico coinvolgimento nell'apoptosi.

Bcl-2

È il prototipo di una famiglia di geni regolatori dell'apoptosi. L'acronimo significa "B-cell lymphoma/leukaemia-2 gene" poiché 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 (Vaux D.L., 1988). Ben presto questo fenomeno fu chiarito come l'esito della soppressione dell'apoptosi (Hockenbery D., 1990). Come prevedibile, l'iperespressione della proteina in diversi tumori è stata

messa in relazione con un'umentata resistenza agli stimoli apoptotici. Questo fatto potrebbe per esempio contribuire all'accumulo di mutazioni in cellule che sarebbero fisiologicamente destinate ad essere eliminate (Collins M.K.L., 1992).

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 (Alison M., 1997).

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 (Oltvai Z., 1993). 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 (Gazzaniga P., 1996).

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 (Gazzaniga P., 1998).

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 (Alison M.R., 1997).

Bag-1

E' una proteina multifunzionale in grado di bloccare l'apoptosi agendo in sinergia con bcl-2 (Packham G., 1997). Ne esistono 3 isoforme umane. Studi immunostochimici 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 (Takayama S., 1998).

c-myc

Il riscontro di elevati livelli di espressione di c-myc in concomitanza con un'umentata apoptosi (Buttayan R., 1988) potrebbe sembrare paradossale visto che c-myc e' noto per la

sua proprietà 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 (Bissonette R.P., 1992). L'effetto pro-apoptotico di c-myc viene prevenuto dalla iperespressione di bcl-2 (Bissonette R.P., 1992).

p53

Abbiamo ricordato nel capitolo 10 come la p53, dopo aver arrestato il ciclo cellulare, sia in grado di indurre l'apoptosi in caso di fallimento dei meccanismi di riparazione del DNA danneggiato (Shaw P., 1992). Come questo possa avvenire non è conosciuto. La p53 normale è per esempio in grado di stimolare la sintesi di bax, che, come abbiamo già ricordato, è 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 (Kawasaki T., 1996).

APOPTOSI E TERAPIE ANTITUMORALI

Radioterapia

Le radiazioni ionizzanti, quando somministrate in piccole dosi, amplificano significativamente l'apoptosi nei tessuti normali, senza produrre necrosi. L'entità di questo fenomeno in un tumore potrebbe essere proporzionale alla sua radiocurabilità (Stephens L.C., 1991).

Il principale responsabile pare essere la p53, che, se in grado di funzionare normalmente, si accumula nelle cellule tumorali in cui vi è stato un danno genomico radio-indotto ed innesca la morte cellulare (Lowe S.W., 1993).

Chemioterapia

Diverse sostanze antitumorali, come ad esempio il cisplatino, si sono dimostrate dei potenti stimolatori dell'apoptosi nelle cellule in rapida proliferazione (Barry M.A., 1990; Cotter T.G., 1992). 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, bclL, bag1, ecc.) e' stata messa in relazione ad un'umentata resistenza agli effetti pro-apoptotici di alcuni chemioterapici (Hickman J.A., 1992).

BIBLIOGRAFIA

Alison M.R. and Sarraf C.E. Apoptosis: regulation and relevance to toxicology. *Hum Exp Toxicol* 1995; 14: 234-247

Alison M. R., Sarraf C. E. *Understanding cancer*. Cambridge University Press. 1997.

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.

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.

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.

Buttayan 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.

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.

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.

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.

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.

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.

Hickman J.A. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11: 121-139.

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.

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.

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.

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.

Kerr J.F.R., Winterford C.M., Harmon B.V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73 (8): 2013-2026.

Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J-L., Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 1995; 9: 1277-1287.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

CAP. 21: 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 (Huovinen R., 1993; Hollowood K., 1991)

Metodi di determinazione

Il conteggio delle cellule apoptotiche uroteliali puo' essere effettuato su sezioni colorate con ematossilina ed eosina ad un ingrandimento 600 X (Lipponen P.K., 1994).

I criteri morfologici per il riconoscimento delle cellule coinvolte nell'apoptosi possono essere riassunti come segue (Hamilton P.W., 1995):

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 (Kelly J.D., 1997).

Valore prognostico

Lipponen (1994) 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. (1996) 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, dopo tutte le premesse fatte nel capitolo 19, poter accettare che un meccanismo potenzialmente "protettivo" in senso antineoplastico si riveli poi essere in pratica un marcatore di prognosi sfavorevole. La correlazione diretta, ma non significativa, dell'IA con la proliferazione tumorale (King E.D., 1996) 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-bcl2 ha reso possibile lo studio dell'immunoreattivita' di questo marcatore anche nei TCC. La positivita' per bcl-2 nell'urotelio normale e' assente (Hockenbery D.M., 1991) oppure confinata esclusivamente agli strati epiteliali basali nel 68% dei casi (Lipponen P.K., 1996) (**Fotografia 4A**). Quest'ultima sembrerebbe suggerire un ruolo del bcl-2 nella regolazione del potenziale di crescita dell'epitelio transizionale non neoplastico. La positivita' "non basale" (cioe' diffusa agli strati epiteliali superiori) nei TCC e' risultata lieve nel 20% (**Fotografia 4B**) ed intensa nel 13% secondo Lipponen (1996); altri autori utilizzano un cut-off del 20%, riscontrando una positivita' del 24% in tumori vescicali invasivi (Glick S.H., 1996).

La **tabella 21** 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 immunoistochimica sincrona di p53 e di bcl-2 (Glick S.H., 1996). Secondo Liukkonen (1997) 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 (Shiina H., 1996).

BAX

Contrariamente a bcl-2, la proteina bax risulta espressa immunohistochimicamente solo negli strati epiteliali superficiali dell'urotelio normale (Bilim V.N., 1998).

Gazzaniga e coll. (1996) 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 più elevato intervallo libero da recidiva rispetto alla situazione inversa ($bcl-2/bax < 1$). Il rapporto bcl-2/bax si è 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. (1998). In tutti i pazienti andati incontro a recidiva entro 1 anno dalla resezione (14 su 43) era presente un rapporto bcl-2/bax > 1 oppure una mutazione del gene p53. Al contrario, nessuna recidiva ad un anno era presente in 17 pazienti con p53 normale e $bcl-2/bax < 1$.

MARCATORI APOPTOTICI DI CHEMIORESISTENZA NEI TCC

L'incubazione di cellule uroteliali neoplastiche per un'ora con MMC ne incrementa l'indice apoptotico rispetto ai controlli (Kelly J.D., 1997). Nel tentativo di interpretare il possibile ruolo dell'espressione di bcl-2 con la chemioresistenza per la MMC intravesicale, abbiamo selezionato due sottogruppi di TCC superficiali suddividendoli in base alla presenza/assenza di recidiva a 3 mesi dopo averli sottoposti a trattamento endovesicale con MMC. Non è stato possibile osservare alcuna correlazione tra recidiva ed immunoreattività per bcl-2 che si è rivelata essere peraltro estremamente infrequente in questa casistica (dati non pubblicati).

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 per la proliferazione, anche 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. (1997). 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. (1997) 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 della terapia. 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 sia dei pazienti da trattare 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, cioe’ 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 cistoscopio 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 immunoistochimiche 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 e’ sufficientemente consistente, un cm³ di tumore viene inviato in apposito terreno di cultura per lo studio di chemiosensibilita’.

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

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.

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.

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 prognostic factor in low-grade urinary bladder cancer. *Int J Cancer* 1996; 69: 100-104.

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.

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.

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.

Hollowood K., Macartney J.C. Reduced apoptotic cell death in follicular lymphoma. *J Pathol* 1991; 163: 337-342.

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.

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.

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.

Lipponen P.K., Aaltomaa S. Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *J Pathol* 1994; 173: 333-339.

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.

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.

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.

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.

INDICE

Introduzione

Parte Prima Fattori Prognostici Tradizionali

Cap. 1 Classificazione dei tumori vescicali

Cap. 2 Fattori prognostici

Fattori prognostici di recidiva e progressione

Fattori prognostici di sopravvivenza

Parte Seconda Marcatori Genomici

Cap.1 Richiami di genetica molecolare

DNA

Trascrizione del DNA in RNA

Trascrizione dell'RNA in proteine

I cromosomi

Mutazioni genomiche

Cap. 2 Approccio allo studio dei marcatori genomici nei TCC

Cap. 3 I geni del cancro: oncogeni e geni soppressori di tumore

Gli oncogeni: protooncogeni attivati

I geni soppressore di tumore: geni inattivati dal cancro

Come sono stati scoperti i geni del cancro

Cap. 4 Tecniche di determinazione dei tumori genici

Tecniche di studio del DNA tumorale

Tecniche di studio dell'RNA dei tumori

Tecniche di studio delle proteine

Cap. 5 La localizzazione degli oncogeni e dei geni soppressori di tumore nella cellula riflette la loro funzione

La cascata oncogenica

Cap. 6 Oncogeni che codificano per fattori di crescita

I fattori di crescita

Valore prognostico dei fattori di crescita nei TCC

Utilità dei fattori di crescita nella pratica clinica

- Cap. 7 Oncogeni che codificano per recettori di fattori di crescita
 - Struttura di un recettore per fattore di crescita
 - Meccanismo d'azione dei recettori per i fattori di crescita
 - Recettori di fattori di crescita nel cancro
 - Recettori di fattori di crescita nei TCC
 - Utilità clinica dei recettori per fattori di crescita nei TCC
- Cap. 8 Oncogeni che codificano per proteine enzimatiche del citoplasma
 - La cascata di eventi RAS-dipendenti che trasportano un segnale proliferativo dal recettore al nucleo
 - RAS
 - SRC
 - Valore prognostico delle proteine oncogeniche citoplasmatiche nei TCC
 - RAS nei TCC
 - SRC nei TCC
 - NF nei TCC
 - RAF e MAP nei TCC
- Cap. 9 Oncogeni che codificano per proteine nucleari (cosiddetti attivatori diretti della trascrizione)
 - c-MYC
 - FOS e JUN
 - Valore prognostico degli oncogeni nucleari nei TCC
 - c-MYC nei TCC
 - JUN nei TCC
- Cap. 10 Geni soppressori di tumore
 - Gene del retinoblastoma (RB)
 - Gene per la proteina p53
 - Funzione fisiologica
 - Inattivazione della p53 nel cancro
 - Le incertezze interpretative derivanti dagli studi sull'ap53 nei TCC
 - Valore prognostico dell'immunoreattività della proteina p53 nei

TCC

Correlazione della p53 con altri marcatori prognostici

I geni CDK2 ed INK4B

Cap. 11 Approccio allo studio dei cromosomi in oncologia

Struttura dei cromosomi

I cromosomi nella varie fasi del ciclo mitotico

Tecniche di studio dei cromosomi

Anomalie cromosomiche nei tumori e loro nomenclatura

Cap. 12 Anomalie cromosomiche nei tumori uroteliali

Le alterazioni cromosomiche di più frequente riscontro nei TCC

Cap. 13 La citoflussimetria del DNA

Metodica

Parametri citoflussimetrici

Parametri citoflussimetrici utilizzati nei TCC

Cap. 14 Utilità della citoflussimetria nei TCC

La citoflussimetria come metodica diagnostica su campioni urinari

Correlazione dei parametri citoflussimetrici con la stadiazione patologica

Valore prognostico dei parametri citoflussimetrici

Cap. 15 Esiste un modello molecolare genetico che spieghi la progressione dei TCC?

Parte Terza Marcatori Proliferativi

Cap. 16 Nozioni generali sui marcatori proliferativi

Richiami sul ciclo cellulare

Classificazione dei metodi di determinazione della proliferazione cellulare

Cap. 17 Marcatori proliferativi non immunoistochimici nei TCC

Percentuale di fase S citoflussimetrica

Indice di Timidina triziata

Conteggio delle mitosi ed Indice Mitotico

Cap. 18 Marcatori proliferativi immunoistochimici nei TCC

Anticorpi contro la 5-bromodesossitimidina (BRDURD)

Antigene nucleare delle cellule proliferative (PCNA)

Anticorpo monoclonale KI67

Quale marcatore proliferativo utilizzare nella pratica clinica?

Cap. 19 Valutazioni proliferative attraverso parametri morfologici

Studio delle regioni di organizzazione nucleolare (NORS)

Cenni sugli studi di morfometria

Parte Quarta Marcatori dell'Apoptosi Cellulare

Cap. 20 I meccanismi dell'apoptosi

Morfologia dell'apoptosi

Differenziazione dalla necrosi

Gli eventi biochimici alla base dell'apoptosi

L'importanza dell'apoptosi in oncologia

Regolazione oncogenica dell'apoptosi

Apoptosi e terapie anti tumorali

Cap. 21 Marcatori dell'apoptosi nei TCC

Indice apoptotico (IA)

BCL-2

BAX

Marcatori apoptotici di chemioresistenza nei TCC

Prospettive di studio sull'apoptosi negli uroteliomi