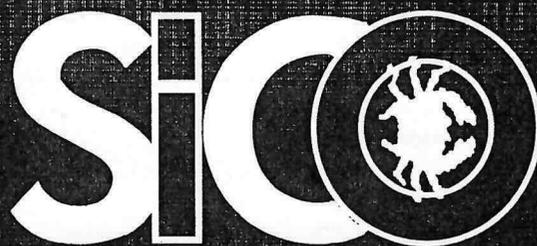


XXIII  
CONGRESSO NAZIONALE



SOCIETÀ ITALIANA DI CHIRURGIA ONCOLOGICA

a cura di  
LUIGI MOGGI

G. GIUSTOZZI • A. BUFALARI • B. SENSI

MONDUZZI EDITORE

# Studio prospettico sul carcinoma del colon e l'angiogenesi. Risultati preliminari

D. PANTALONE<sup>1</sup>, M. ZICHE<sup>2</sup>, L. MORBIDELLI<sup>3</sup>,  
A. PARENTI<sup>3</sup>, S. DONNINI<sup>3</sup>, M. PAZZAGLI<sup>4</sup>,  
L. MESSERINI<sup>5</sup>, A.R. PALOMBA<sup>5</sup>, B. NERI<sup>6</sup>,  
M.T. GEMELLI<sup>6</sup>, M. NINCHERI KUNZ<sup>7</sup>,  
P. LIGUORI<sup>7</sup>, F. TARUFFI<sup>7</sup>, R. PAOLUCCI<sup>7</sup>  
e F. ANDREOLI<sup>7</sup>

*Patologia Chirurgica II, Istituto di Clinica Chirurgica Generale e D.C.  
Università di Firenze*

*Istituto di Scienze Farmacologiche  
Università di Siena*

*Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica*

*Unità di Biochimica Clinica, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica*

*Istituto di Anatomia Patologica*

*Day Hospital Oncologico*

*Dipartimento di Medicina Interna*

*Istituto di Clinica Chirurgica Generale e D.C.*

*Patologia Chirurgica II*

*Istituto di Clinica Chirurgica Generale e D.C.*

*Università di Firenze*

## SOMMARIO

In questa ricerca abbiamo studiato neoplasie coliche Dukes' B. Lo studio si è svolto in una fase retrospettiva (60 pz.) (età 39-75anni) e in una fase prospettica (10 pz.) (età 52-70 anni). Per lo studio retrospettivo è stata effettuata la valutazione del grado di angiogenesi su materiale paraffinato utilizzando l'anticorpo monoclonale per l'antigene endoteliale CD34 e l'anticorpo policlonale F-VIII per il Fattore VIII. Lo studio prospettico prevede di utilizzare anche materiale a fresco, sul quale sono state effettuate misure quantitative dell'espressione dell'angiogenesi (VEGF). L'obiettivo è quello di correlare l'andamento clinico di questi pazienti con l'angiogenesi sia sotto il profilo prognostico che sotto i possibili aspetti terapeutici.

XXIII Congresso  
Nazionale



SOCIETÀ ITALIANA  
DI CHIRURGIA  
ONCOLOGICA

Perugia  
16-18 settembre 1999



## INTRODUZIONE

Il metabolismo, l'accrescimento e la tendenza alla diffusione ematogena dei tumori solidi dipendono da un processo chiamato «angiogenesi». La neoformazione di vasi peritumorali, oltre a consentire l'apporto di nutrienti per la proliferazione cellulare e l'eliminazione dei metaboliti, favorisce ed accelera la disseminazione di cellule neoplastiche in sedi lontane dalla neoplasia primitiva, condizionando il potenziale metastatico del tumore. Studi di tipo morfologico e immunostochimico condotti su più tipi di tumore (cancro della mammella, del polmone, dello stomaco colon-retto, etc.) indicano che la densità e il numero di vasi neoformati correlano con il potenziale metastatico del tumore, rappresentando quindi un innovativo ed importante aspetto prognostico e un utile parametro della capacità metastatizzante dei tumori. Questo studio verte sulle neoplasie del colon e l'angiogenesi come fattore prognostico. Sono stati selezionati pazienti portatori di una neoplasia colica in stadio B di Dukes', perché essi rappresentano un gruppo eterogeneo ai fini della prognosi, e perché i pazienti con linfonodi positivi, segno di una fase già più avanzata di malattia, hanno un andamento sfavorevole più prevedibile e meglio codificato ai fini terapeutici. Inoltre i meccanismi di trasformazione neoplastica delle neoplasie coliche sono stati ben studiati ed in letteratura sono presenti numerosi lavori sull'angiogenesi, sui suoi rapporti con la progressione neoplastica e sul suo valore come «fattore prognostico» a sostegno della nostra ipotesi di partenza. Lo studio si è articolato in una fase retrospettiva e in una fase prospettica.

## MATERIALI E METODI

### Studio retrospettivo

La prima fase retrospettiva è stata condotta su materiale paraffinato (60 pz.) di 26 donne e 34 uomini (età media rispettivamente di  $64,8 \pm 8,3$  anni e di  $63,1 \pm 7,8$ ). Pazienti sottoposti a terapia adiuvante o con cancro familiare sono stati esclusi dallo studio. Le sedi della neoplasia erano: colon ascendente (12 casi), trasverso (6 casi) colon discendente (14 casi), sigma (28 casi). I blocchetti selezionati erano quelli relativi al fronte di crescita tumorale al limite con la mucosa indenne. Le sezioni ( $4 \mu\text{m}$  di spessore) sono state trattate con metodo immunostochimico con due anticorpi: anticorpo monoclonale per l'antigene endoteliale CD34 e anticorpo policlonale F-VIII per il fattore VIII. Per ogni tumore è stata individuata l'area con maggiore espressione di angiogenesi ad un ingrandimento  $\times 100$  (fig.9) e successivamente ad ingrandimento maggiore ( $\times 250$ ) è stato contato il numero di neovasi in tale area. E' stato così individuato un valore medio di  $36,4 \pm 11,2$  che è servito come determinante per l'angiogenesi: casi ad elevata espressione di angiogenesi ( $> 36,4 \pm 11,2$ ) da casi a bassa espressione di angiogenesi ( $< 36,4 \pm 11,2$ ).

### Studio prospettico

Selezione dei pazienti: Lo studio prospettico prevede un protocollo di prelievo in base ai seguenti criteri: -età  $< 75$  anni. Localizzazione del tumore: colon. Stadio preoperatorio Dukes'B con conferma istologica sul

pezzo operatorio. Prelievo secondo schema (mucosa sana al limite superiore del pezzo operatorio, mucosa a 2 cm dal tumore, prelievo di tessuto tumorale al margine con mucosa macroscopicamente indenne contigua (fronte di crescita), tumore nella zona centrale). Sono stati arruolati al momento 25 pazienti. Di questi pazienti ne sono stati valutati 10. Sui campioni paraffinati è stata eseguita la quantificazione della MVD. 36 è stato il valore soglia di MVD, determinato con metodo immunostochimico. In base a questo valore i casi sono stati suddivisi: ad elevata espressione di angiogenesi (MVD > 36) e a bassa espressione di angiogenesi (MVD ≤ 36). Sui campioni di tessuto prelevato a fresco e poi congelato di questi stessi pazienti è stato isolato l' RNA messaggero dei frammenti tumorali e della mucosa sana.

Retrotrascrizione e reazione a catena della polimerasi (RT-PCR)

È stata utilizzata la reazione a catena della polimerasi (PCR) a partire da uno stampo di DNA (PCR) o RNA (RT-PCR) per ottenere informazioni di carattere quantitativo sull'espressione di RNA messaggero dei fattori di crescita (VEGF), mediante il sistema «TaqMan» (analisi quantitativa della RT-PCR). Tale dosaggio di RNA messaggero, effettuato con sonde fluorogeniche, permette la rivelazione in tempo reale di prodotti specifici di amplificazione. La misura del segnale specifico viene eseguita attraverso il sistema fluorimetrico ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer).

## RISULTATI E CONCLUSIONI

### Parametri istopatologici

Per quanto riguarda il grading, era presente una maggiore percentuale di G<sub>2</sub> (80%) ma non erano evidenziabili differenze significative nella presenza o meno della angiogenesi in relazione a questo parametro. Per quanto riguarda lo score di Jass, la presenza di angiogenesi si correlerebbe meglio con la crescita di tipo «infiltrating» (50%). Per la invasione dei vasi venosi peritumorali la presenza di microangiogenesi sarebbe ben correlabile (41,6%) con l'invasione dei vasi venosi da parte delle cellule tumorali.

### Metastasi e sopravvivenza

La comparsa di metastasi ben si correla con i casi ad elevata espressione di MVD, infatti dei pazienti che hanno sviluppato metastasi (ovariche: 2, epatiche: 20, epatiche e polmonari: 2) (40%), 21 pz. (87,5%) avevano una elevata MVD e solo 3 pz. (12,5%) presentavano una bassa MVD. La sopravvivenza globale è stata il 60% (36 pz.). Le curve di sopravvivenza secondo Kaplan Meier calcolate in base alla presenza di elevata e di bassa espressione di MVD mostrano una caduta della curva di sopravvivenza dopo i 2 anni dall'intervento nei pazienti con tumori ad elevata espressione di MVD.

I risultati preliminari dello studio prospettico mostrano un consistente aumento nell'espressione di RNA messaggero per il VEGF nel tessuto tumorale rispetto alla mucosa sana. Tale aumento risulta di circa 100 volte maggiore. È presente inoltre una differenza importante anche tra l'espressione dell'RNA messaggero nel «core» del tumore e quella rilevata al margine del tumore stesso con la mucosa macroscopicamente sana.

XXIII Congresso  
Nazionale



SOCIETÀ ITALIANA  
DI CHIRURGIA  
ONCOLOGICA

Perugia  
16-18 settembre 1999



Quindi i nostri dati retrospettivi, seppur considerati come parametri percentuali puri, si allineano con quelli presenti in letteratura confermando alla quantificazione dei vasi neoformati (MVD) il ruolo di fattore prognostico negativo correlabile alla predizione di metastasi e ad una scarsa sopravvivenza. I risultati preliminari fino ad ora ottenuti nello studio prospettico indirizzano la nostra attenzione sul fronte di crescita tumorale più che sul «core» del tumore. Infatti mentre è evidente, e, per così dire, «attesa» la differenza tra «core» tumorale e mucosa sana, i valori registrati nei campioni relativi al margine macroscopico del tumore mostrano una espressione quantitativa elevata, anche più elevata di quella presente nel «core» tumorale.

In questa fase preliminare, non si può ancora attribuire a questi risultati una correlazione con una maggiore aggressività della neoplasia, o una loro possibile ricaduta sul fronte terapeutico. Tuttavia il ruolo della angiogenesi non si arresta solo all'aspetto prognostico, ma sono già in corso studi clinici controllati per valutarne l'effetto terapeutico in monoterapia e in associazione alle terapie complementari; i due agenti antiangiogenici e chemioterapici, agirebbero su popolazioni di cellule bersaglio diverse tra loro: i primi su cellule endoteliali con patrimonio genetico stabile, mentre i secondi su cellule tumorali con patrimonio genetico instabile, facili alle mutazioni con maggiori capacità di sviluppare resistenza ai farmaci. La combinazione di queste terapie, in casi selezionati, potrebbe risultare più efficace della monoterapia ed influire positivamente sulla prognosi di questi pazienti.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285:1182-1186, 1971
- 2) Folkman J.: Tumour angiogenesis: diagnostic and therapeutic clinical applications. Salomon S.E. ed *Adjuvant therapy of cancer VII*, 1993 JB Lippincott company 27-33.
- 3) Frank R., Saclarides T.J., Leurgans S., et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node negative colon cancer. *Ann. Surg.* 222 (6):695-699, 1995.
- 4) Folkman J.: New perspective in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur J. Cancer* 32A (14): 2534-2539, 1996.
- 5) Folkmann J., D'Amore P.A.: Blood vessel formation: what is its molecular basis. *Cell* 87: 1153-5, 1996.
- 6) Ellis L.M. and Fidler I.J.: Angiogenesis and metastasis. *Eur J. Cancer* 32A (14): 2451-2460, 1996.
- 7) Takahashi Y., Tucker S.L., Kitadai Y, et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Arch. Surg.* 132:541-546, 1997.
- 8) Meyer T. and Hart I.R.: Mechanism of tumour metastasis. *Eur. J. Cancer* 34(2):214-221, 1998.
- 9) Mc Namara D.A., Harmey J.H., Walsh T.N., Redmond H.P. and

Bouchier-Hayes D.J.: Significance of angiogenesis in cancer therapy. *Br. J. Surg.* 85:1044-1055, 1998.

10) Hanahan D.A.: A flankin attack on cancer. *Nat. Med.* 4:13-14, 1998.

11) Zimmerman MA, Selzman CH, and Harken AH. Surgical implications of therapeutic angiogenesis. *Surgery* 125(3):243-249, 1999

XXIII Congresso  
Nazionale



SOCIETÀ ITALIANA  
DI CHIRURGIA  
ONCOLOGICA

Perugia  
16-18 settembre 1999