CELLULE STAMINALI

COMPARTIMENTO STAMINALE NELL'EPITELIO INTESTINALE

Più di 30 anni fa, Cheng e Leblond hanno formulato la teoria unitaria, secondo la quale tutte le linee cellulari dell'epitelio intestinale derivano da un'unica cellula staminale e quindi costituiscono una popolazione clonale (1).

Le cellule staminali (SC) sono fondamentali per l'equilibrio di tessuti quali epidermide, sangue, epitelio intestinale in quanto ne garantiscono l'autorinnovamento durante la vita dell'organismo e costituiscono una riserva in caso di danno. La loro "staminalità" si manifesta attraverso le capacità di automantenimento (self-renewal) e di dare origine a tutte le cellule differenziate che caratterizzano ciascun tipo di tessuto (multipotenza) (2,3).

Basandosi sulla loro capacità di differenziare, le cellule staminali possonoessere classificate come totipotenti, in grado di dare origine ad un intero organismo, pluripotenti, capaci di generare quasi tutti i tessuti di un organismo, multipotenti, in grado di differenziare nelle diverse linee cellulari di un tessuto.

Le capacità di differenziare delle cellule staminali dipendono dallo stadio dello sviluppo considerato: la perdita della totipotenza avviene in seguito alla formazione dello strato di cellule interne alla blastocisti, le cosiddette staminali embrionali pluripotenti.

Le cellule staminali adulte o tissutali sono capaci di automantenersi, ma sono già commissionate in direzione delle linee cellulari dell'organo in cui si trovano. Esse sono coinvolte nell'omeostasi del tessuto, ma anche nella rigenerazione in seguito a un danno. Studi su tessuti a rapido rinnovamento quali sangue, intestino ed epidermide, indicano un'eterogeneità della percorrenza del ciclo cellulare delle cellule staminali tissutali. Si possono considerare due gruppi di cellule staminali: uno costituito dalla maggior parte delle staminali e coinvolto

nell'omeostasi fisiologica e quindi in attiva proliferazione e l'altro, composto da un piccolo pool di SC, caratterizzato da lenti cicli cellulari, che entra in azione durante la rigenerazione (4).

Un'altra scuola di pensiero identifica le vere cellule staminali adulte con il piccolo pool di cellule che rimangono in uno stato di quiescenza per larga parte della loro vita e, quando vanno incontro a divisione, il loro ciclo è lento e le divisioni sono asimmetriche, ovvero portano alla formazione di una cellula figlia con caratteristiche di staminalità identiche alla cellula madre e di una cellula progenitrice (transit-amplifying cell o TA cell) che, in seguito a successivi cicli di replicazione, perderà progressivamente le caratteristiche di cellula staminale e differenzierà nelle linee cellulari proprie del tessuto. Le cellule TA hanno, perciò, una durata della vita limitata e vengono periodicamente sostituite dalle cellule staminali adulte.

Lo stato di quiescenza, proprio delle cellule staminali, rappresenta un meccanismo di difesa e protezione dalle mutazioni; inoltre, poichè le SC sono fondamentali per la crescita e la riparazione dei tessuti, hanno sviluppato meccanismi per evitare l'apoptosi e sono, per questo, radio- e chemio-resistenti. Il loro basso ritmo di proliferazione fornisce protezione nei confronti del danno al DNA, evita il loro esaurimento e, in ultima analisi, protegge l'organismo da una loro crescita non regolata (5).

L'identificazione delle cellule staminali tissutali passa attraverso la dimostrazione delle loro proprietà di base, cioè l'automantenimento e la multipotenza in vitro e in vivo.

La mancanza di marker specifici per la maggior parte delle staminali tissutali ha portato a impiegare marker di staminalità surrogati, quali il mantenimento della marcatura nella molecola di DNA, basandosi sull'assunto che le cellule

staminali tissutali sono quiescenti e si dividono molto più lentamente della loro progenie.

Nel 1975 John Cairns propose, in alternativa, l'ipotesi dell' "immortal strand" come uno dei meccanismi di autoprotezione messi a punto dalle cellule staminali. Secondo tale ipotesi il filamento di DNA della cellula madre rimane come patrimonio genetico della cellula staminale figlia, mentre il filamento di nuova sintesi, in cui la probabilità di avere errori di replicazione è maggiore, segrega nella cellula TA. In questo modello si giustificava il persistere del DNA marcato nelle cellule staminali (6). L'ipotesi è stata messa in dubbio in quanto non sono noti meccanismi che portino alla conservazione del DNA stampo nella cellula madre.

Tuttavia recentemente è stata proposta l'ipotesi del "silent sister chromatide" secondo la quale, durante la mitosi, si ha una segregazione dei cromatidi fratelli non casuale. Nel modello la cellula figlia che mantiene le caratteristiche della staminale conserva i cromatidi contenenti attivi i geni che portano l'informazione relativa alla staminalità, mentre la cellula che eredita i cromatidi fratelli silenti sarebbe una cellula TA (7).

Anche questa ipotesi non è confermata sperimentalmente, anzi gli studi sulle cellule staminali emopoietiche non dimostrano una segregazione selettiva del DNA parentale, né un mantenimento della marcatura.

I modelli storici riguardanti l'identificazione delle cellule staminali tissutali intestinali sono anch'essi di circa trent'anni fa e in ciascuno di essi si partiva dal presupposto che ogni cripta dovesse contenere circa sei SC.

La prima ipotesi descriveva la cripta come un "tubo" a fondo cieco contenente cellule proliferative, alla base del quale vi erano le cellule del Paneth e subito sopra, nella posizione 4 partendo dal fondo, le cellule staminali (8). Il secondo modello prevedeva la presenza di una popolazione di cellule in attiva

proliferazione, dette cellule colonnari alla base della cripta (crypt base columnar cells, CBC), intervallate tra le cellule del Paneth (9).
Nessuna delle due ipotesi è stata, però, supportata da prove sperimentali di staminalità.
Si pensa che le cellule staminali siano localizzate all'interno di un microambiente, anatomicamente e funzionalmente ben definito in ciascun tessuto, detto "nicchia", che le protegge dai processi di differenziazione, apoptosi e ne mantiene la capacità di autorinnovamento.
La nicchia è costituita da una complessa rete di cellule, componenti della matrice extracellulare, citochine, fattori di crescita e molecole che mediano le giunzioni cellula-cellula e cellula-matrice (5).
Un interessante gruppo di cellule della nicchia, non ancora troppo conosciuto, è quello delle cellule mesenchimali staminali (MSC). Questo tipo cellulare è caratterizzato da un fenotipo simile ai fibroblasti e pare abbia un potenziale immunomodulatorio, dovuto alla secrezione di prostaglandine E2, e favorisca l'angiogenesi (10). Inoltre, la nicchia in cui si trovano le cellule staminali intestinali (ISC) comprende cellule epiteliali differenziate, miofibroblasti, cellule del sistema immunitario, cellule endoteliali, cellule nervose, integrine, proteine della matrice extracellulare, molecole che mediano segnali endocrini e fattori legati alle vie di segnalazione Wnt, Notch, BMP (Bone Morphogenetic Protein) e Hedgehog (Hh) (5,10).
Gli stimoli prodotti a livello della nicchia regolano l'equilibrio del compartimento staminale, mantenuto anche dalle proprietà intrinseche delle SC. Più in generale, possiamo dire che nel contesto di un tessuto normale il microambiente è essenziale per il corretto commissionamento di una popolazione cellulare. La nicchia e la sua complessa rete di segnali e stimoli consente alle cellule staminali, estremamente "versatili", di seguire il giusto

percorso di differenziazione: ad esempio, le cellule staminali nervose, se coltivate insieme ai mioblasti, differenziano in cellule del tessuto muscolare (11).

La via Wnt gioca un ruolo importante nel mantenimento del compartimento staminale e nei processi di proliferazione. I progenitori delle cellule epiteliali, situati alla base della cripta, accumulano β-catenina a livello nucleare, prova evidente di segnale Wnt attivo. L'inattivazione del segnale Wnt per eliminazione del fattore Tcf4 o della β-catenina oppure per overespressione dell'inibitore di Wnt Dickkopf1 (Dkk-1) si traduce nella perdita dell'attività proliferativa. Ciò sottolinea il fatto che la via di segnalazione Wnt è la principale forza che guida la proliferazione a livello delle cripte intestinali (3).

La Notch pathway è importante nei processi di differenziazione (12).

I geni Notch codificano per recettori transmembrana coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare, differenziazione e sopravvivenza delle cellule staminali e/o dei progenitori in un ampio gruppo di tessuti. Nei vertebrati si distinguono 4 tipi di recettori Notch: Notch-1, 2, 3, 4, la cui attività è modulata dalle famiglie di ligandi Delta-like (Dll 1,3,4) e Jagged (1 e 2).

L'attivazione dei recettori, mediante legame recettore-ligando, ne provoca il taglio proteolitico da parte delle proteasi TACE o Kuzbanian e della γ-secretasi. In seguito a questo processo di taglio viene rilasciato all'interno della cellula il dominio intracellulare del recettore Notch, definito $Notch^{IC}$, che trasloca all'interno del nucleo. Qui si lega alle DNA-binding protein, RBPJk/CBF-1, e a proteine regolatrici della trascrizione e attiva la trascrizione di una serie di geni, altrimenti silenti. L'inattivazione della Notch pathway, in particolare l'inibizione dell'attività del fattore RBPJk/CBF-1 o della γ-secretasi, provoca un'elevata espressione di Math1 (attivatore trascrizionale della famiglia bHLH indispensabile per i processi di differenziazione delle cellule della linea

secernente dell'epitelio del colon) e una prematura conversione delle cellule TA della cripta in cellule caliciformi (13).

Il fattore BMP è espresso nella zona mesenchimale dei villi; quando lega uno dei suoi recettori (BMPR) trasduce un segnale dal citoplasma al nucleo mediante fosforilazione del fattore di trascrizione SMAD mediata dal recettore. Si attiva così una cascata di segnali che regolano negativamente l'attività proliferativa a livello delle cripte. La delezione di uno dei recettori BMP comporta, per contro, un processo di iperproliferazione e l'inibizione del segnale BMP nel villo, mediato dall'inibitore specifico Noggin, provoca formazione di cripte ectopiche. Questo fenomeno si osserva in pazienti affetti da poliposi giovanile, dove nel 50% dei casi si hanno mutazioni dei vari componenti della via BMP (12).

Le interazioni epitelio-mesenchima avvengono anche nella direzione opposta: la Hedgehog pathway e il PDGF-A (Platelet Derived Growth Factor A) sembrano giocare un ruolo importante in questo senso. Le cellule epiteliali esprimono i ligandi Sonic Hedgehog (Shh) e Indian Hedgehog (Ihh), che si legano ai recettori Patched1 e 2espressi dalle cellule mesenchimali. L'inibizione del segnale mediato da Hedgehog, tramite overespressione dei relativi inibitori, provoca una riduzione dei villi e una iperproliferazione dell'epitelio (12). Ne consegue che il segnale mediato da Hedgehog è antagonista della via di segnalazione Wnt, inibendo la proliferazione in cellule Hh^+ e limitando le divisioni al compartimento delle cellule staminali (14).

I MARKER DELLE CELLULE STAMINALI

Gli studi relativi ai meccanismi molecolari che controllano i processi di autorinnovamento e di carcinogenesi hanno dato impulso alla ricerca di marker specifici delle cellule staminali.

Il ruolo della via Wnt nell'intestino suggerisce che uno o più geni target coinvolti possano essere considerati marker delle SC.

Il programma genetico attivato in modo non corretto a causa della perdita di funzionalità della proteina APC (Adenomatous Polyposis Coli) nelle cellule del cancro è lo stesso espresso nelle cellule proliferative delle cripte sane.

Un pool di circa 80 geni è coinvolto nella via di segnalazione Wnt: la maggioranza è espressa nelle cellule della cripta, ma solo un piccolo gruppo può essere considerato identificativo del compartimento proliferativo.

Uno di questi geni è **Lgr5/Gpr49**; esso codifica per un recettore accoppiato ad una proteina G orfana con dominio extracellulare ricco in leucina e sette domini transmembrana. Lgr5 è stato studiato per la prima volta come un gene target della via Wnt nel cancro del colon.

Nei topi adulti Lgr5 è espressa da un numero limitato di cellule nell'intestino, nei follicoli piliferi, nell'occhio, nel cervello, nella ghiandola mammaria, nello stomaco e negli organi riproduttivi.

Esperimenti di ibridazione in situ rivelano che l'espressione di Lgr5 è specifica del fondo della cripta intestinale e ciò è confermato da prove di knock-in in cui il gene LacZ viene integrato in prossimità della regione N-terminale del primo dominio transmembrana: le cellule positive per Lgr5 sono in attiva proliferazione e il loro tempo di ciclo è di 1 giorno (3).

Le cellule Lgr5^{+}sono risultate essere capaci di dare origine a tutte le linee cellulari dell'epitelio intestinale in un periodo di 60 giorni e questo induce a ipotizzare che questa molecola possa identificare le cellule staminali dell'intestino tenue e del colon (5). Lo studio delle cellule Lgr5^{+}ha permesso anche l'identificazione di Achaete-scute like2 (Ascl2), fattore di trascrizione del tipo helix-loop-helix, la cui espressione nell'epitelio intestinale è controllata dalla via Wnt ed è limitata alle celluleLgr5^{+}(10).

È stato dimostrato che mutazioni di **BMPR**, **SMAD4** e **PTEN** (phosphatase and tensin homolog) danno origine alla poliposi intestinale, suggerendo un ruolo chiave di BMP e PTEN nelle cripte (15).

Il fattore BMP è espresso in modo differente lungo l'asse della cripta: all'apice BMP1-2-5-7, SMAD7 e il recettore BMPR2 sono fortemente espressi, mentre alla base della cripta si ha elevata espressione dei fattori antagonisti di BMP, ovvero gremlin1 e 2 (GREM1-2) e chordin-like1. Questi sono prodotti dai miofibroblasti e dalle cellule del sottostante tessuto muscolare liscio e contribuiscono alla modulazione della via Wnt (4). Il segnale mediato da BMP funziona come regolatore negativo dei processi di proliferazione delle SC intestinali: il knock-out specifico di BMPR1 ha come conseguenza la formazione di polipi intestinali, derivanti da un incremento dell'autorinnovamento delle cellule staminali. È stato proposto che BMP incrementi l'attività di PTEN il quale, a sua volta, funziona come regolatore negativo della PI3K-Akt e provoca il silenziamento del segnale Wnt. PTEN inattivo è considerato un marker delle SC (15).

PTEN è un oncosoppressore coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare in numerosi tessuti e può inibire la tumorigenesi, agendo negativamente su attività proliferativa e crescita incontrollata; ha un ruolo anche nella migrazione cellulare, nei meccanismi di adesione e nell'angiogenesi. La perdita della funzionalità di questo gene porta all'iperattivazione di Akt e quindi ad una regolazione negativa dell'apoptosi ed è associata alla chemio-resistenza (5).

Musashi(Msi-1) è una RNA-binding protein identificata nelle cellule staminali nervose della Drosophila e ritenuta cruciale nella regolazione della loro divisione asimmetrica. Si pensa agisca come repressore della traduzione e regolatore della via Notch, in particolare sul fattore Hes-1, fondamentale per la

differenziazione delle cellule della linea secernente (cellule caliciformi, enteroendocrine e del Paneth).

L'omologo Musashi-1 nei mammiferi è stato proposto come marker sia delle cellule staminali sia dei progenitori epiteliali per il fatto che si è ritrovato in molte cellule della cripta. Esso, tuttavia, è prevalentemente espresso nelle cellule alla base della cripta, comprese quelle che si trovano fra le cellule del Paneth. Inoltre alcune cellule positive per Msi-1 lo sono anche per Ki-67, noto marker di proliferazione ed è riportata una coespressione di Msi-1 e Lgr5 nell'intestino tenue (14,15).

Doublecortin e Calmodulin Kinase-like1(DCAMKL) è una proteina associata ai microtubuli, espressa in alti livelli nello sviluppo del tessuto nervoso. Recentemente è stata identificata anche a livello delle cripte intestinali. Per capire quali cellule della cripta la esprimono sono stati fatti esperimenti di marcatura a impulso a breve termine con bromodesossiuridina (BrdU); le cellule non marcate con BrdU nel fondo della cripta, quindi quelle non in proliferazione al momento dell'impulso, esprimevano DCAMKL-1 che per questo è stata proposta come marker delle cellule staminali (15).

DCAMKL-1 è espressa anche in un piccolo gruppo di cellule Msi^+. Le cellule DCAMKL-1^+ si dimostrano resistenti all'apoptosi dopo irradiazione; infatti 24 ore dopo l'esposizione solo poche cellule staminali/progenitrici sono in apoptosi. In seguito ad esposizione a dosi letali di radiazioni la proteina non è presente nelle cellule in attiva proliferazione delle cripte in rigenerazione, ma la sua espressione è ripristinata 7 giorni dopo l'irradiazione. Sembra che la popolazione di cellule DCAMKL-1^+ sia costituita da cellule quiescenti (4).

Durante lo sviluppo e la tumorigenesi, nella regolazione della migrazione cellulare e della formazione di confini ben precisi fra i vari tessuti sono importanti le interazioni fra i **recettori Eph** e i relativi ligandi. EphB2 è

fortemente espresso nella membrana delle cellule in posizione 4-6 della cripta (la posizione ipotizzata per le SC) e la sua espressione diminuisce andando verso la parte alta di questa.

I ligandi, le efrine B1 e B2, hanno un' espressione bassa nelle cellule alla base della cripta e via via crescente nelle cellule situate in posizioni più elevate.

Le cellule epiteliali dell'intestino si ancorano alla membrana basale mediante l'interazione delle i**ntegrine**, famiglia di glicoproteine eterodimeriche transmembrana, con il collagene, la laminina e la fibronectina, situati nella membrana basale. Il segnale mediato dalle integrine è stato dimostrato essere importante nella proliferazione, nel differenziamento e nella sopravvivenza cellulare. In particolare, l'espressione dell'integrina α2β1 è ristretta alla regione delle cellule staminali delle cripte e la delezione dell' integrina β1 si traduce nell'iperplasia dell'epitelio dovuta alla perdita del segnale Hedgehog mediato dalle integrine (15).

CD133 (Prominin-1) è considerato un marker sia delle cellule staminali normali che tumorali in quanto le SCs tumorali hanno origine dalle SCs normali. Le cellule positive per CD133 aumentano nel cancro del colon retto rispetto al tessuto normale, in accordo con l'ipotesi di un'espansione del compartimento staminale che si pensa contribuisca allo sviluppo del tumore (5,14,16).

LE CELLULE STAMINALI TUMORALI

Il modello tradizionale della carcinogenesi prevede che una qualsiasi cellula dell'organismo, accumulando mutazioni multiple che le conferiscono un potenziale proliferativo illimitato, possa dare origine a un tumore. La progenie risultante acquisisce altre mutazioni e costituisce una popolazione cellulare eterogenea dal punto di vista genetico sulla quale si esercita una pressione selettiva che, nel tempo, favorisce l'espansione di sottopopolazioni più resistenti.

Negli ultimi anni si è fatta strada l'ipotesi, sostenuta da prove sperimentali, che la capacità di iniziare lo sviluppo di un tumore sia, invece, una proprietà di cellule con le caratteristiche della staminalità. Quindi la crescita tumorale sarebbe sostenuta da un piccolo sottogruppo della popolazione, le cellule staminali tumorali (CSC, Cancer Stem Cell).

Nei tessuti in condizioni fisiologiche si evidenzia un'organizzazione gerarchica articolata in compartimenti che sono caratterizzati da differenti capacità di auto mantenimento e di proliferazione (4,17,18).

Ad una estremità della gerarchia cellulare si trovano le cellule staminali tessuto-specifiche, in numero limitato, dotate delle proprietà di automantenersi per tutta la vita dell'organismo e di dare origine alle cellule commissionate, proliferative che amplificano la popolazione cellulare e generano le cellule specializzate del tessuto per differenziazione.

Una simile gerarchia si è osservata nei tessuti neoplastici, dove le cellule vanno incontro ad autorinnovamento e differenziazione incontrollati, formando una popolazione eterogenea. Innescare il meccanismo di proliferazione incontrollata in una cellula staminale può essere più facile che in una cellula differenziata; inoltre, le cellule staminali hanno una lunga vita e quindi una maggiore probabilità di accumulare mutazioni. Per queste ragioni è plausibile che, nella genesi del cancro, il bersaglio delle mutazioni e del processo di trasformazione siano le cellule staminali.

Il concetto di cellula staminale tumorale è stato proposto per la prima volta nei mielomi e nelle leucemie, dove alcuni esperimenti dimostrarono che solo una piccola percentuale di cellule tumorali (1-4%) era capace di iperproliferare e formare colonie.

Successivi esperimenti suggerirono che anche nei tumori solidi, compreso il cancro del colon retto, solo 1 cellula su 1000 o 5000 (0.01% o 0.002%) era in

grado di formare colonie in agar semisolido o masse tumorali ectopiche se iniettata in topi nudi.

Da questi risultati è stata formulata l'ipotesi che solo una piccola percentuale di cellule presenti in un tumore sia tumorigenica e che siano proprio queste cellule le responsabili della metastatizzazione e delle recidive dopo escissione chirurgica e radio o chemioterapia.

Benché le CSC mostrino caratteristiche simili alle cellule staminali tissutali normali, è possibile che esse non derivino necessariamente da una SC mutata, ma possano avere origine anche da una cellula tumorale che ha acquisito nel tempo le caratteristiche della "staminalità".

Secondo questa ipotesi sarebbe più corretto chiamare le CSC "tumor-initiating cells".

Recenti studi su topi hanno, tuttavia, accreditato la prima ipotesi, ovvero dell'origine delle CSC da una cellula staminale mutata per una grande varietà di tumori, incluso il cancro del colon retto (17).

È necessario sottolineare che le CSC nei tumori primitivi non esibiscono sempre le proprietà classiche delle cellule staminali normali (automantenimento e differenziazione in diversi tipi cellulari) e che il numero di CSC identificate con i test funzionali varia molto da paziente a paziente.

Nel contesto di condizioni instabili e perturbate, come il cancro, non è affatto sorprendente che le CSC abbiano un comportamento eterogeneo e si può verosimilmente supporre che le loro proprietà siano influenzate dallo stadio della malattia e dai trattamenti farmacologici.

Per comprendere la relazione fra le cellule staminali e le CSC i programmi di trascrizione delle cellule staminali embrionali (ESC) sono stati confrontati con quelli delle cellule staminali dei tessuti e delle CSC, sfruttando la bioinformatica. Un programma di trascrizione del tipo cellula staminale embrionale sembra

essere attivato in diversi tumori umani e costituisce un indice predittivo di probabilità di metastatizzazione e di sopravvivenza. L'oncogene c-Myc è sufficiente per l'attivazione dei programmi di trascrizione di tipo embrionale e per l'incremento della frazione delle cellule staminali tumorali.

L'attivazione di questi programmi di trascrizione, simili a quelli delle ESC può avvenire, in teoria, anche in cellule differenziate che acquisirebbero, perciò, un'anomala e patologica capacità di autorinnovamento e si comporterebbero come CSC.

Se una specifica sottopopolazione di cellule tumorali possiede caratteristiche tipiche delle cellule staminali, allora le CSC rappresentano una proprietà intrinseca della biologia e dello sviluppo del tumore. Su questo agiscono, inoltre, in modo determinante il microambiente circostante e il sistema immunitario dell'organismo (19).

È ragionevole estendere anche alle CSC il concetto di nicchia che potrebbe costituire per esse un insieme di condizioni protettive nei confronti di varie forme di danno, compresi quelli dovuti ai trattamenti radio e chemioterapici.

Studi su cellule di medulloblastoma coltivate in assenza o presenza di cellule endoteliali dimostrano che in presenza di cellule endoteliali i tumori crescono più velocemente e raggiungono dimensioni maggiori con un aumento del numero di cellule iniziatrici del tumore e con un incremento della loro capacità di automantenimento. Il dato sperimentale è la conferma che i differenti componenti della nicchia influenzano la crescita e la differenziazione (5).

Le cellule staminali tumorali necessitano di un ambiente fortemente ipossico per sopravvivere, poiché l'angiogenesi non segue il rapido processo di proliferazione e si può verificare che le cellule al centro della massa tumorale non abbiano un adeguato apporto di ossigeno e nutrienti.

Nella condizione ipossica e di carenza di nutrienti le CSC tendono a manifestare il loro fenotipo staminale come meccanismo di autoconservazione; quando, invece, ossigeno e nutrienti sono disponibili, tendono a differenziare.
Questo ha un forte impatto a livello terapeutico, in quanto un fenotipo differenziato è associato a un ritmo di proliferazione basso e ad un minore potenziale tumorigenico; la differenziazione indotta e forzata delle CSC potrebbe costituire essa stessa un approccio terapeutico (16,18).
L'interesse che è stato suscitato dall'ipotesi delle cellule staminali tumorali non è solo di tipo culturale, ma ha anche un ben più importante risvolto pratico. Infatti, l'esistenza di questa popolazione cellulare, la definizione delle sue caratteristiche e l'identificazione mediante specifici marker costituisce una base di partenza per mettere a punto nuove strategie terapeutiche.
Le CSC potrebbero essere i bersagli di approcci terapeutici diretti, volti alla loro selettiva eliminazione mediante farmaci indirizzati da specifici marker molecolari o attraverso specifiche vie di segnalazione, oppure le CSC potrebbero essere modificate nella loro resistenza ai trattamenti o indotte a differenziare.
Inoltre, si profila un ampio spettro di strategie terapeutiche indirette, quali una terapia antiangiogenetica, un'immunoterapia e la distruzione delle interazioni, favorevoli allo sviluppo del tumore, tra CSC e microambiente.
È ovvio che lo scenario descritto non può prescindere dall'identificazione delle CSC e dalla conoscenza delle loro caratteristiche.
Un esempio della quantità di marker studiati e proposti per i differenti tumori maligni è riportato nella tabella sottostante (18).

CSC nei tumori umani

Tumore	Fenotipo molecolare	N° citazioni
AML	$CD34^{+}CD38^{-}$	23
Vescica	$Lin^{-}CD44^{+}CK5^{+}CK20^{-}$	29
Mammella	$CD44^{+}CD24^{-/lo}Lin^{-}EPCAM^{+}$	30
SNC	$CD133^{+}$	31
Colon	$CD133^{+}$	33
Colon	$CD133^{+}$	34
Colon	$EPCAM^{hi}CD44^{+}Lin^{-}(CD166^{+})$	32
Ewing	$CD133^{+}$	40
Testa e collo	$CD44^{+}Lin^{-}$	35
Fegato	$CD90^{+}$	39
Melanoma	$ABCB5^{+}$	13
Ovaio	$CD44^{+}CD117^{+}$	36
Pancreas	$CD44^{+}CD24^{+}EPCAM^{+}$	38
Pancreas	$CD133^{+}$	37

AML, leucemia mieloide acuta

Fino dall'inizio è stata cruciale l'identificazione del marker di superficie CD133 nelle leucemie e più recentemente nei tumori solidi. Una volta isolate le cellule positive per il marker, è necessario dimostrarne la tumorigenicità in topi immunodeficienti.

Studi sui tumori colorettali hanno consentito di isolare una sottopopolazione di cellule, circa il 2.5% del totale, $CD133^{+}$ capaci di sviluppare il cancro in animali riceventi, mentre le cellule $CD133^{-}$ non portano alla formazione del tumore. Inoltre, queste cellule $CD133^{+}$ sono in grado di crescere in modo esponenziale in sferoidi coltivati in vitro per oltre un anno.

Anche in altri modelli sperimentali le cellule identificate dal marker si sono dimostrate capaci di mantenere se stesse, di iniziare la crescita del tumore e di dare origine a cellule differenziate, mantenendo così l'eterogeneità originale presente nella neoplasia.

Nella ricerca di marker specifici è stata isolata una sottopopolazione di cellule di cancro colorettale con elevata espressione di EpCAM e $CD44^{+}$, presenti con

una frequenza variabile tra 0.03% e 38% e dotate di proprietà tumorigeniche in vivo. I tumori risultanti mantengono un fenotipo differenziato che riassume l'aspetto istopatologico dei tumori da cui è stata ottenuta la popolazione selezionata.

Infine, sono stati proposti come identificativi delle CSC del cancro colorettale CD166 e Lgr5. In particolare l'espressione di quest'ultimo marker sembra correlata con lo stadio della malattia, dato che fornisce una prova dell'associazione tra numero di CSC e progressione tumorale e che induce a proporre un utilizzo delle cellule staminali del cancro anche come fattore predittivo di prognosi (2,5,11,20).

IL CARCINOMA DEL COLON RETTO

Il carcinoma del colon retto rappresenta una delle più frequenti cause di morte per neoplasia nei Paesi Occidentali; risulta essere il terzo tipo di tumore più comune e il secondo negli USA, senza distinzione tra sessi, né per incidenza né per prognosi. In Europa vengono diagnosticati 200.000 casi all'anno, di cui 40.000 in Italia, dove i decessi causati da questa malattia sono 18.000 (21,22).
Numerosi sono i fattori di rischio non genetici chiamati in causa per il carcinoma colorettale: una dieta ricca in grassi animali e carne rossa, lo stile di vita, il consumo di tabacco (anche se il suo ruolo non è ancora ben certo e definito), l'infezione da parte dell'Helicobacter pylori. Quest'ultimo favorirebbe la tumorigenesi attraverso due vie: un'infiammazione cronica iniziale e la produzione di metaboliti batterici carcinogenici, quali radicali liberi e composti nitrosi, che promuovono la proliferazione cellulare (21,23).
Dall'altra parte si hanno una serie di agenti chemioprotettivi, capaci di ridurre il rischio di sviluppo di adenomi e/o carcinomi colorettali: il carbonato di calcio, che agisce sequestrando gli acidi grassi e gli acidi biliari intraluminali, inibisce la proliferazione cellulare modulando l'attività della proteina chinasi C, stabilizzando le membrane e modificando le mutazioni del gene k-ras e la vitamina D (24,25).
Molecole quali retinoidi, carotenoidi, acido ascorbico, vitamina E e il selenio sono in grado di neutralizzare i radicali liberi riducendo il danno al DNA indotto dai carcinogeni. Anche i farmaci anti-infiammatori non steroidei (NSAIDS) e la terapia ormonale sostitutiva (HRT) hanno un importante ruolo chemiopreventivo: i primi inibiscono le ciclossigenasi COX1 e COX2 (quest'ultima overespressa nelle neoplasie colorettali invasive e pre-invasive), riducono la proliferazione e la neoangiogenesi, inducono apoptosi e

promuovono il controllo da parte del sistema immunitario; la HRT contribuisce all'inibizione dell'Insuline-like Growth Factor I e riduce la produzione degli acidi biliari secondari (25,26). L'effetto tumorigenico della COX2 è attribuito alla produzione di prostaglandina E2; aumentati livelli di questa sono stati ritrovati negli adenomi e nei carcinomi colorettali.

COX2 e la prostaglandina E2 regolano la proliferazione, la sopravvivenza cellulare, la migrazione e l'angiogenesi durante la carcinogenesi (26). L'impiego di fattori nutrizionali e agenti farmacologici, seguiti dalle metodologie di screening, costituisce una valida strategia per bloccare o invertire il processo di tumorigenesi prima del raggiungimento dello stadio invasivo e la loro efficacia è subordinata allo studio e alla comprensione dei processi molecolari alla base della malattia (24).

Numerosi studi dimostrano come l'aspettativa di vita cresca con la diagnosi precoce; ad oggi i test di screening maggiormente impiegati nella diagnosi del cancro del colon retto sono:

- la ricerca del sangue occulto nelle feci (FOBT), tecnica non invasiva ma poco sensibile, soprattutto nell'identificare lesioni primitive come polipi adenomatosi che non sempre provocano sanguinamento;
- l'esplorazione del tratto distale del retto che consente la diagnosi fino al 10-15% dei tumori del grosso intestino;
- la sigmoidoscopia flessibile, esame ad elevata sensibilità (96% per i tumori avanzati e grossi polipi e 73% per piccoli polipi), che permette una diretta visualizzazione del colon e l'ottenimento di biopsie;
- le indagini radiologiche con bario come mezzo di contrasto, anche se maggiormente impiegate in passato;

- la colonscopia, esame invasivo ma estremamente accurato nella diagnosi, è l'unico che consente screening, diagnosi e trattamento dell'intero colon in un'unica procedura (21,25).

  Il carcinoma colorettale è suddiviso in forme sporadiche e in forme familiari o ereditarie (HNPCC e FAP). Tranne che per le sindromi familiari, è impossibile determinare se il verificarsi della malattia nell'ambito familiare sia dovuto alla predisposizione o al caso; allo stesso modo, in una forma sporadica, l'apparente assenza di una storia familiare potrebbe non riflettere la reale situazione (27).

  La HNPCC (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer) o sindrome di Lynch è causata da mutazioni nella linea germinale dei geni mismatch repair (MMR) MSH2 e MLH1 ed è caratterizzata da una spiccata instabilità dei microsatelliti (corte ripetizioni di sequenze di DNA). Predispone, oltre che al cancro del colon retto, a tumori in numerose altre sedi, quali cervello, urotelio, stomaco, endometrio, ovaie, intestino tenue ed epitelio epatobiliare (28).

  La FAP (Familial Adenomatous Polyposis) si distingue dalla sindrome di Lynch in quanto vengono identificati polipi alla diagnosi (29); infatti è caratterizzata dalla presenza di numerose (centinaia-migliaia) formazioni polipose nel colon retto che solitamente compaiono nella seconda o terza decade di vita; dal punto di vista molecolare la malattia origina da una mutazione a livello della linea germinale a carico del gene APC. Se non trattata la FAP progredisce fino ad originare un adenocarcinoma (28).

  Anatomicamente l'intestino è suddiviso in intestino tenue e colon; le sue principali funzioni sono la digestione e l'assorbimento dei nutrienti. Il lume dell'intestino è rivestito da un epitelio monostratificato la cui organizzazione è simile a livello dei due tratti. Istologicamente, tuttavia, sono riscontrabili due

importanti differenze: l'epitelio del colon non presenta villi e le cellule del Paneth sono assenti (12).

Nell'intestino tenue la superficie aumenta esponenzialmente grazie alla presenza dei villi, nei quali si trovano tre tipi di cellule differenziate: gli enterociti, con funzione assorbente, le cellule mucipare caliciformi, secernenti muco e le cellule enteroendocrine, secernenti ormoni. Tre giorni dopo la completa differenziazione queste cellule raggiungono l'apice del villo e, successivamente ad un processo di apoptosi spontanea, vengono rilasciate nel lume dell'intestino.

Le cellule del Paneth rappresentano un'eccezione in quanto, pur essendo cellule differenziate, secernenti lisozimi e peptidi con funzione battericida, risiedono alla base della cripta e quindi non seguono il naturale processo di migrazione verso l'apice del villo.

Le cellule proliferative si trovano nelle cripte di Lieberkühn, dove risiedono le cellule staminali e le cellule progenitrici, ovvero le cellule in proliferazione e transito (transit-amplifying cells o TA cells). Quest'ultime rimangono nella cripta circa due giorni, durante i quali si dividono 4-5 volte prima di differenziarsi nei diversi tipi di cellule epiteliali specializzate (12).

Il carcinoma colorettale si sviluppa in seguito ad una serie di alterazioni geniche che portano alla perdita dell'equilibrio fisiologico tra proliferazione, differenziazione e perdita cellulare (23). Dal punto di vista istologico si descrivono una serie di modificazioni: la prima alterazione tissutale individuabile nello sviluppo del carcinoma colorettale è rappresentata dalle cosiddette "cripte aberranti" o ACF (Aberrant Crypt Foci) che presentano una crescita di tipo clonale e un'espansione della zona proliferativa verso il lume dell'intestino. Si distinguono ACF con cellule non displastiche e con cellule displastiche, dalle

quali si originano i polipi, le prime lesioni osservabili macroscopicamente, che possono essere sessili, peduncolati e, più raramente, piatti (30).
Lo stadio successivo è rappresentato dall'adenoma; secondo il sistema WHO si distinguono adenomi tubulari, villosi, tubulo-villosi e serrati in base alla loro diversa morfologia.
L'adenoma tubulare conserva l'architettura propria delle ghiandole intestinali, anche se con cellule non completamente differenziate, con una caratteristica struttura ramificata a cripte allungate, mentre nel villoso si formano espansioni di tipo digitiforme; nel tubulo-villoso sono presenti entrambi le componenti, mentre l'adenoma serrato è una forma molto rara, caratterizzata dalla configurazione seghettata del polipo iperplastico (21).
Con l'aumento delle dimensioni e delle atipie cellulari un adenoma può evolvere a carcinoma in situ e poi, eventualmente, sviluppare una lesione invasiva in grado di dare metastasi (30).
Nel 1990, Fearon e Vogelstein per primi proposero un "multistep genetic model" (adenoma-carcinoma sequence) per la carcinogenesi del tumore del colon retto, modello di base per la progressione tumorale in tutte le sedi dell'organismo (26).
Le alterazioni geniche responsabili dell'insorgenza e della progressione della malattia sono a carico, principalmente, di due classi di geni: i proto-oncogeni, che agiscono in modo dominante e sono responsabili della trasduzione degli stimoli proliferativi e i geni oncosoppressori, che agiscono in modo recessivo, controllano l'apoptosi e la proliferazione e vengono inattivati durante la progressione neoplastica (22,31).
La prima alterazione genetica, che dà inizio alla tumorigenesi, coinvolge APC, gene situato sul cromosoma 5q21, fondamentale nella via di segnalazione Wnt. Mutazioni del gene APC nella linea germinale sono responsabili della FAP e

coinvolgono l'intero gene, mentre nella linea somatica sono limitate alla regione del gene tra i codoni 1286 e 1513 e si riscontrano nel 5% delle cripte aberranti, nel 30-70% degli adenomi sporadici e nel 72% e oltre dei tumori conclamati, indicando come tale mutazione sia all'inizio della carcinogenesi.

L'ipermetilazione del promotore del gene, meccanismo alternativo per l'inattivazione di APC, si riscontra nel 18% degli adenomi e dei carcinomi.

Il prodotto del gene APC è una grossa proteina costituita da diversi domini funzionali che regolano la differenziazione, l'adesione intercellulare, la polarità cellulare, la migrazione, lo sviluppo, l'apoptosi e la segregazione dei cromosomi. Una delle funzioni più importanti di questa proteina si esplica nell'interazione con la glicogeno sintasichinasi-3β e con la β-catenina, entrambe componenti essenziali della Wnt pathway. APC lega la β-catenina, la glicogeno sintasi chinasi-3β e la caseina chinasi 1α/ε al sistema axina/conduttina; la conseguente fosforilazione della β-catenina da parte della glicogeno sintasi chinasi-3β ne innesca la degradazione proteasoma-dipendente e la soppressione del segnale Wnt.

APC mutato non è più in grado di codificare per una proteina capace di formare il complesso di degradazione e ciò provoca un progressivo incremento delle concentrazioni citoplasmatiche di β-catenina e una conseguente traslocazione della proteina nel nucleo, dove attiva e coordina la trascrizione di numerosi geni implicati nella crescita tumorale, attraverso l'interazione con fattori di trascrizione quali T-cell factor/lymphoid enhancer factor.

Mutazioni a carico di β-catenina sono state trovate nel 50% dei tumori del colon che presentano APC intatto, dimostrando come le alterazioni di APC e di β-catenina non siano funzionalmente equivalenti (26).

Successive mutazioni avvengono a carico dell'oncogene k-ras. K-ras è mutato nel 30-50% dei tumori del colon. Questo gene codifica per una G-proteina

monomerica, definita p21 in base al peso molecolare, implicata nei meccanismi di trasduzione del segnale. Essa è dotata di un'attività GTP-asica che viene annullata in seguito a mutazioni puntiformi nei codoni 12 e 13 dell'esone 2 e nel codone 61 dell'esone 3; la proteina k-ras mutata è perennemente attiva e responsabile di una trasmissione incontrollata dello stimolo proliferativo (26,30).
Ras attivata regola numerose funzioni cellulari attraverso specifici effettori. Il più importante, oltre che il meglio caratterizzato, è costituito dalla pathwayRaf-mitogen-activated protein kinase (MEK)-extracellular signal regulated kinase (ERK). La famiglia Raf include tre serina/treonina chinasi (ARAF, BRAF e RAF1), le quali attivano MEK1 e 2 che a loro volta fosforilano ERK1 e 2.
ERK porta avanti la fosforilazione di substrati citosolici e nucleari, inclusi JUN e ELK1, che regolano molecole come la ciclina D1, indispensabile per il controllo della progressione del ciclo cellulare.
TP53 è un gene oncosoppressore ed è localizzato sul braccio corto del cromosoma 17; codifica per unfattore di trascrizione di 393 aminoacidi (53 KDa) fondamentale nel controllo della risposta cellulare a stress tra i quali il danno al DNA, segnali proliferativi alterati e stress ossidativi (26). In seguito ad un danno al DNA provocato da radiazioni, raggi UV o agenti mutageni chimici i livelli di p53 aumentano all'interno della cellula, la proteina si va a legare al DNA e stimola la trascrizione di geni coinvolti in due meccanismi fondamentali: il blocco nella fase G1 del ciclo cellulare, per riparare i danni al DNA o, eventualmente, l'innesco del processo apoptotico mediato da geni quali BAX e IgF-BP3 nel caso in cui la cellula non sia stata capace di riparare il DNA. Se il danno è stato riparato con successo i livelli di p53 diminuiscono grazie all'intervento di MDM2 che ne guida la degradazione proteasoma-dipendente. Quando p53 è mutata questo controllo non si verifica e si ha una overespressione della proteina.

Alterazioni a carico di p53 costituiscono un marker tipico dei tumori umani e la sua perdita di funzione è dimostrata nel 4-26% degli adenomi, nel 50% degli adenomi con foci invasivi e nel 50-75% dei carcinomi colorettali, sottolineando la sua importanza nella transizione da adenoma a carcinoma. L'80% delle mutazioni sono missenso e provocano la sintesi di una proteina inattiva, caratterizzata da una lunga emivita, facilmente identificabile con tecniche immunoistochimiche. Normalmente la proteina wild type ha una breve emivita e si mantiene a bassi livelli, non identificabili, all'interno della cellula (26,32,33).
La perdita allelica a livello del cromosoma 18q è stata riscontrata in oltre il 70% dei tumori colorettali in stadio avanzato.Il gene DCC (deleted in colon cancer), situato su questo cromosoma, fu inizialmente proposto come oncosoppressore, ma successivamente si è visto che il suo prodotto è un recettore di superficie per la proteina netrina-1, presente a livello del tessuto nervoso; mutazioni di DCC sono raramente presenti e identificabili nei tumori del colon retto. Inoltre studi su topi hanno dimostrato che questi non sviluppano tumori pur avendo DCC mutato e ciò ha sollevato molti dubbi circa il ruolo di questo gene nella patogenesi del cancro colorettale.
Altri geni oncosoppressori presenti sul cromosoma 18q sono SMAD2 e SMAD4, mediatori intracellulari della pathway di TGFβ, importante per i processi di regolazione della crescita cellulare, differenziazione e apoptosi. Tuttavia solo in una piccola percentuale (<20%) dei tumori del colon retto sono state trovate mutazioni su questi geni.
Il tasso di mutazioni di base (pari a 10^{-9} per paia di basi per generazione cellulare) è insufficiente a spiegare il numero di mutazioni che sono richieste nello sviluppo del cancro. Per questo, come suggerito da Loeb (34), le cellule tumorali devono acquisire un certo grado di instabilità genomica, un "fenotipo mutante" che aumenta il tasso di nuove mutazioni.

Nella patogenesi del cancro colorettale si osservano almeno tre pathway distinte per realizzare l'instabilità genomica: l'instabilità cromosomica (CIN), l'instabilità dei microsatelliti e la metilazione delle isole CpG. CIN è presente nel 65-70% delle forme sporadiche di tumore colorettale e comporta progressivi incrementi o perdite di intere o parziali zone cromosomiche: come conseguenza si ha un'alterazione del numero dei cromosomi (aneuploidia), amplificazione del genoma e un'elevata frequenza di perdita di eterozigosi (LOH, loss of heterozigosity).

LOH è la caratteristica principale dei tumori con instabilità cromosomica: il 25-30% degli alleli sono persi nei tumori. Nell'uomo i cromosomi 1, 5, 8, 17, 18 sono i più soggetti al fenomeno di LOH. Spesso il cromosoma 18 viene perso interamente e ciò, pare, in seguito alla non disgiunzione durante la mitosi, ma si può avere anche perdita parziale, causata da ricombinazioni intercromosomiche e delezioni associate a rotture della doppia elica. Le alterazioni genetiche specifiche che determinano gli eventi di LOH, però, non sono state ad oggi identificate.

L'instabilità cromosomica può manifestarsi in seguito a meccanismi difettosi della segregazione dei cromosomi, ad anomalie a livello dei telomeri e della risposta ai danni al DNA.

Il checkpoint mitotico è un meccanismo di controllo fondamentale che assicura la giusta segregazione dei cromosomi durante l'anafase e consente di ritardarne l'inizio per il corretto allineamento in piastra metafasica di tutti i cromatidi. Difetti nella segnalazione intracellulare provocano una segregazione errata e una conseguente aneuploidia nelle cellule figlie.

Una distribuzione anomala dei cromosomi è provocata anche da un mal funzionamento dei centrosomi, derivato dalla presenza sovranumeraria di questi nella cellula: si è visto che i centrosomi in più causano la formazione di

poli multipli del fuso mitotico, provocando una segregazione cromosomica disuguale.

Si può avere CIN, inoltre, in seguito a mal funzionamento dei telomeri. I telomeri sono complessi DNA-proteine costituiti da ripetizioni esameriche (TTAGGG nell'uomo) che proteggono le parti terminali dei cromosomi eucariotici da fusione e rottura durante la segregazione.

Nelle cellule somatiche si perde una porzione del DNA telomerico ad ogni divisione a causa dell'incapacità della DNA polimerasi di sintetizzare in modo completo l'estremità 3' dei cromosomi. Raggiunta una lunghezza critica del telomero, i checkpoint che rilevano il danno al DNA inducono la senescenza e l'apoptosi. Le cellule che non entrano in senescenza sono caratterizzate da una morte cellulare massiva, mentre quelle che sopravvivono al punto di crisi attivano la telomerasi, un complesso enzimatico che allunga i telomeri. Se la protezione mediata dai telomeri è compromessa le parti terminali dei cromosomi vanno incontro ad una serie di rotture e fusioni con altri ed il fenomeno si propaga alle generazioni successive di cellule, provocando una riorganizzazione del genoma (26). Telomeri di ridotta lunghezza sono stati evidenziati nelle forme displastiche di alto grado e in un'elevata proporzione (70-90%) di cancri del colon, ma nei tumori colorettali si riporta anche un aumento dell'attività della telomerasi. Questi reperti discordanti potrebbero indicare un diverso ruolo temporale per i due eventi: l'accorciamento dei telomeri come causa dell'instabilità cromosomica nella fase iniziale della carcinogenesi, l'attivazione della telomerasi negli stadi finali del processo come presupposto per l'immortalizzazione delle cellule tumorali.

Il 15% dei tumori del colon retto è caratterizzato dal fenomeno di instabilità dei microsatelliti (MSI). Essi sono corte ripetizioni in tandem di 1-5 paia di basi disperse nel genoma, situate in regioni non codificanti. L'instabilità

microsatellitare consiste in una modificazione di lunghezza variabile nei microsatelliti stessi causata da inserzione o delezione di unità ripetute ed è dovuta al fallimento del sistema di Mismatch Repair del DNA (MMR) (35,36).

PARAMETRI PROGNOSTICI: VARIABILI CLINICO-ISTOPATOLOGICHE E VARIABILI BIOLOGICHE

Si definisce fattore prognostico quel marker che permette di avere informazioni relative alla sopravvivenza e alla ripresa di malattia del campione di pazienti in esame in relazione al periodo di follow-up. Un marker prognostico, inoltre, deve rispondere a due requisiti importanti: deve avere un significato prognostico indipendente dallo stadio della malattia e deve poter essere valutato con metodi standardizzati e riproducibili. La prognosi di pazienti affetti da carcinoma del colon retto viene valutata tenendo presente le caratteristiche clinico-istopatologiche ed in particolare lo stadio.

Da molto tempo, la stadiazione TNM e i fattori clinico-istopatologici hanno permesso di programmare le terapie adiuvanti al fine di aumentare la probabilità di sopravvivenza in pazienti con lesioni precoci. Tuttavia il decorso della malattia di ogni singolo paziente, in relazione alle categorie della stadiazione TNM, è estremamente variabile e il metodo di classificazione, basato sulle caratteristiche topografiche della malattia e sull'estensione di questa, non fornisce informazioni sulla biologia della neoplasia. Per questo esiste la possibilità di associare specifici marker cellulari e molecolari all'estensione del tumore, alla positività linfonodale e alla presenza o meno di metastasi con l'obiettivo di definire una vera e propria mappa molecolare della malattia (37).

Nel 1999-2000 si è tenuta la Consensus Conference (38) che ha definito le seguenti quattro categorie principali di fattori prognostici convenzionali e innovativi:

I- fattori il cui ruolo prognostico è stato stabilito in molti studi clinici e che sono stati utilizzati nella pianificazione del trattamento dei pazienti (es.l'estensione locale del tumore, l'invasione dei linfonodi locoregionali, la presenza di micrometastasi linfonodali, l'invasione dei piccoli vasi sanguigni, i livelli sierici di CEA, antigene carcino-embrionario)

IIA- fattori biologici e/o clinici studiati in modo approfondito, il cui valore prognostico e/o predittivo di risposta al trattamento è stato dimostrato, ma che devono essere validati dal punto di vista statistico (es. il grado di differenziazione del tumore, la positività dei margini di resezione, la presenza di tumore residuo in seguito a terapia neoadiuvante)

IIB- fattori per i quali non ci sono risultati sufficienti ad includerli nelle due categorie precedenti (es. il tipo istologico del tumore, l'instabilità dei microsatelliti, le delezioni di cromosomi, la valutazione macroscopica del margine del tumore)

III- fattori che non sono stati sufficientemente studiati per stabilire il loro valore prognostico (es.marcatori genetici quali p53, Bcl-2, ras, c-myc, p21, p27, p15, p16, il contenuto di DNA, l'angiogenesi)

IV- fattori che non hanno valore predittivo di prognosi e/o di risposta al trattamento; tra questi le caratteristiche macroscopiche e le dimensioni del tumore (39-41).

Il metodo di stadiazione TNM si basa sulla valutazione di tre parametri: T, ovvero l'estensione locale del tumore primario non trattato al momento della diagnosi; N, ovvero la valutazione dello stato dei linfonodi locoregionali; M, ovvero la presenza o meno di metastasi a distanza (21).

Il prefisso "p" si riferisce alla determinazione patologica del TNM, in contrasto con la determinazione clinica indicata con il prefisso "c". Nella tabella che segue

è riportato uno schema che riassume le diverse classi ottenute in base ai tre parametri.

TNM PATOLOGICO	
pT	***tumore primitivo***
pT_x	tumore non definibile
pT_0	tumore non evidenziabile
pTis	carcinoma in situ
pT_1	tumore che infiltra la sottomucosa
pT_2	tumore che infiltra la tonaca muscolare
pT_3	tumore che infiltra a tutto spessore la tonaca muscolare
pT_4	tumore che infiltra altri organi e/o strutture e che penetra nel peritoneo parietale con o senza coinvolgimento di una struttura adiacente
pN	***linfonodi regionali***
pN_x	non valutabili
pN_0	linfonodi regionali liberi da metastasi
pN_1	metastasi in 1-3 linfonodi regionali
pN_2	metastasi in 4 o più linfonodi regionali
pM	***metastasi a distanza***
pM_x	metastasi non accertabili
pM_0	metastasi assenti
pM_1	metastasi presenti

Stadio 0	Tis	N_0	M_0
Stadio I	T_1-T_2	N_0	M_0
Stadio IIA	T_3	N_0	M_0
Stadio IIB	T_4	N_0	M_0
Stadio IIIA	T_1-T_2	N_1	M_0
Stadio IIIB	T_3-T_4	N_1	M_0
Stadio IIIC	ogni T	N_2	M_0
Stadio IV	ogni T	ogni N	M_1

Nel recente passato sono stati proposti sistemi di stadiazione alternativi rispetto a quello TNM, quali lo stadio secondo Dukes (42) e secondo Jass; quest'ultimo prende in esame anche il pattern di crescita del tumore e l'invasione linfocitaria peritumorale (43,44).

Tra le caratteristiche clinico-istopatologiche il grado di differenziazione (G) risente di variabili come la soggettività e la mancanza di riproducibilità, e non contribuisce alla definizione della prognosi. Età, sesso, dimensioni e sede del tumore danno risultati controversi per poter essere correlati con l'evoluzione della malattia.

Tra i parametri biologici più studiati nel carcinoma colorettale ci sono quelli correlati alla proliferazione cellulare, al contenuto di DNA, molecole regolatrici del ciclo cellulare e dell'adesione intercellulare, fattori di crescita e fattori angiogenetici e loro rispettivi recettori.

I parametri di proliferazione sono utili nel dare informazioni riguardanti la capacità di crescita della lesione tumorale e sono potenzialmente correlati alla sua aggressività e alla risposta al trattamento radio e chemioterapico.

La valutazione dell'indice mitotico (MI) per studiare la proliferazione cellulare è stata sostituita, nel tempo, da altri metodi che risentono meno di variabili come la breve durata della mitosi e la soggettività dell'operatore. Tra questi, l'analisi

delle cellule in fase S mediante l'utilizzo di analoghi della Timidina (5-Bromodesossiuridina BrdU e Timidina Tritiata 3H-TdR), che vengono incorporati dalle cellule in attiva sintesi del DNA. L'incorporazione viene evidenziata mediante tecniche immunoistochimiche per la BrdU e istoautoradiografiche per la 3H-TdR. I parametri indicanti l'attività proliferativa sonoil BrdU LI (BrdULabelling Index) e il TLI (Thymidine Labelling Index) e vengono espressi come rapporto percentuale tra le cellule marcate e le cellule totali presenti nella sezione istologica esaminata.

Il TLI è considerato il parametro di riferimento tra tutti quelli correlati alla proliferazione e alcuni studi hanno evidenziato come pazienti affetti da carcinoma colorettale in stadio Dukes A-D con TLI<10% avessero una prognosi migliore, sottolineando una relazione statisticamente significativa tra sopravvivenza e TLI (45).

Un metodo più rapido per stimare la percentuale di cellule in fase S è rappresentato dall'analisi del contenuto di DNA in citofluorimetria a flusso; il parametro che ne deriva è l'SPF (S-PhaseFraction). Esso può assumere un range di valori piuttosto ampio (0-75%) e il suo significato prognostico è tuttora controverso e discusso: alcuni studi dimostrano una relazione tra SPF e stadio della lesione e presenza di cloni cellulari non diploidi, altri non osservano alcuna correlazione tra SPF ed età, sesso, sede della neoplasia e grado di differenziazione (46).

L'attività proliferativa di un tessuto può essere valutata anche mediante lo studio, in immunoistochimica, di antigeni associati a determinate fasi del ciclo cellulare, come Ki-67 e PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Il Ki-67 Labelling Index (Ki-67 LI) è ancora dibattuto come marker di prognosi,in quanto la proteina può essere espressa anche da cellule appena entrate in G0, nelle fasi iniziali del processo di differenziazione e in seguito a blocco della sintesi di

DNA, indotta da un danno al genoma. Il range di valori di Ki-67 LI nel tumore del colon retto è piuttosto ampio (1-80%) e di ordine crescente nella sequenza adenoma-carcinoma (47).

Alcuni studi hanno dimostrato che alti tassi di proliferazione risultano associati ad elevati valori di OS (OverallSurvival) e DFS (Disease Free Survival); altri, al contrario, hanno riportato che elevati valori del parametro sono correlati con una prognosi sfavorevole. Anche studi relativi ad una possibile relazione del parametro con lo stadio del tumore si mostrano discordanti, non evidenziando talvolta alcun legame, talvolta livelli di Ki-67 più elevati in lesioni iniziali e in forme meno differenziate (46).

Il PCNA è un fattore ausiliario della polimerasi δ che partecipa ai processi di replicazione e riparazione del DNA. La concentrazione di questa proteina aumenta in fase G1, presenta un picco massimo in S e diminuisce in G2 e M; tuttavia, poichè ha una lunga emivita, può essere riscontrata anche in cellule che hanno terminato il proprio ciclo riproduttivo. Anche il PCNA LI aumenta durante l'evoluzione da adenoma a carcinoma (48), ma come il Ki-67 LI ha un significato prognostico discusso.

Il contenuto di DNA definisce il grado di ploidia di una popolazione cellulare ed è valutato mediante il DNA Index (DI), dato dal rapporto, in citofluorimetria, tra il valore medio di fluorescenza del picco delle cellule in fase G_0/G_1 della popolazione in esame e il valore medio del picco delle cellule in G_0/G_1 di una popolazione diploide di riferimento. DI=1 è caratteristico di cellule con un normale cariotipo diploide.

Numerosi studi hanno dimostrato un collegamento tra contenuto di DNA e acquisizione di malignità: risulta aneuploide il 30% degli adenomi, l'82% dei tumori primari, il 57% delle metastasi linfonodali, il 92% delle metastasi epatiche e il 100% delle metastasi a distanza (48).

Il significato prognostico del grado di ploidia risulta ancora controverso: alcuni risultati mostrano come pazienti con tumore diploide abbiano una prognosi migliore relativamente alla sopravvivenza a 5 anni (49,50), mentre altri associano una prognosi peggiore a pazienti con tumori diploidi, affermando che questo risultato sia dovuto all'associazione tra la diploidia e MSI (instabilità dei microsatelliti) (51).

Numerose anomalie di oncogeni e oncosoppressori sono state proposte come indicatori prognostici o fattori predittivi di risposta al trattamento.

P53 è stato il primo oncosoppressore ad essere studiato come fattore prognostico e tale interesse è da ricercare nel ruolo chiave del gene p53, definito "guardiano del genoma", codificante una proteina importante per il controllo del ciclo cellulare in seguito a danno al DNA. Nonostante numerosi studi, condotti negli anni, non è stata trovata, ad ora, una relazione statisticamente significativa tra l'espressione di p53 e il sesso, l'età, la sede e lo stadio del tumore. Varie ricerche hanno dimostrato un elevato numero di casi p53+ in tumori in stadio Dukes D e in tumori localizzati nella parte sinistra del colon; inoltre, si è visto che gli adenocarcinomi presentano una più alta positività per p53 rispetto alle forme colloidi (33) e che pazienti che overesprimono la proteina hanno una prognosi migliore (32).

Mutazioni di k-ras sono associate ad una prognosi sfavorevole, suggerendone un possibile ruolo come marker di fenotipo tumorale aggressivo (52).

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) è responsabile di una cascata di eventi che innescano l'adesione cellulare, la proliferazione, la differenziazione, l'apoptosi e la metastatizzazione. Il suo ruolo come fattore prognostico nel carcinoma del colon retto è stato investigato in uno studio su pazienti con tumore in stadio II: in questo contesto assume un significato sfavorevole di prognosi.

C-MET codifica per una proteina recettoriale specifica per il fattore di crescita epatocitario; l'overespressione di C-MET è stata correlata con un'infausta prognosi in numerosi cancri (polmone, stomaco, fegato, endometrio e faringe), ma i dati relativi al carcinoma colorettale non risultano attualmente conclusivi (53).

In numerosi studi è stata presa in esame anche la perdita di espressione di p27, inibitore del ciclo cellulare, che conferirebbe alle cellule tumorali la capacità di crescere in un ambiente con caratteristiche di adesività alterate, processo che facilita la ripresa di malattia: una downregulation di questo marker, associata a mutazione di p53 ed immunoreattività per VEGF definisce una prognosi avversa con un tasso di ripresa di malattia del 100% (54).

Anche la mancata espressione di Bcl-2 è associata ad un aumentato rischio di morte e, parallelamente, si evidenzia una relazione tra positività e prognosi favorevole (55).

Oltre a molecole direttamente coinvolte nel processo di tumorigenesi, alcuni studi hanno preso in esame i marcatori del siero, il cui livello può essere monitorato prima e dopo l'intervento chirurgico fornendo cosi informazioni sul possibile decorso della malattia. Uno di questi parametri è il CEA, una glicoproteina della famiglia delle immunoglobuline, i cui livelli pre-operatori alti sono correlati, secondo alcuni studi, con una prognosi peggiore, in maniera del tutto indipendente dallo stadio (56,57). La misurazione dei livelli post-operatori di CEA può dare informazioni sulla presenza di malattia residua o di eventuali metastasi a distanza, in quanto il parametro rientra nei valori normali circa sei settimane dopo la resezione chirurgica (58).

La crescita, in dimensioni, di una lesione tumorale è condizionata dalla disponibilità di una rete circolatoria vasale adeguata per l'apporto di ossigeno e nutrienti. Per questo sono stati proposti come fattori prognostici molecole

coinvolte nel processo di angiogenesi, correlate ad invasività e metastatizzazione. Il fattore VEGF è importante come regolatore positivo dell'angiogenesi e stimola la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali; studi dimostrano che i suoi livelli pre-operatori nel siero correlano in maniera significativa con età, stadio di Dukes e valore di CEA, ma non correlano con localizzazione e grado di differenziazione della neoplasia e sono predittivi di prognosi in relazione a DFS e a OS (59).

Altri autori riportano un comportamento più aggressivo del cancro del colon quando VEGF è overespresso, mentre non rilevano alcuna correlazione tra il parametro e il decorso clinico della malattia, rendendo difficoltoso un chiarimento sul reale valore prognostico del marker neoangiogenetico (54).

I marker di adesione intercellulare sono indice di capacità di metastatizzare e quindi di aggressività biologica della neoplasia. Le molecole di adesione più significative per il carcinoma colorettale sono le E-caderine, le β-catenine e le varianti della molecola CD44.

Un'espressione aberrante in tumori epiteliali di caderine e catenine, normalmente espresse a livello di membrana è, in genere, indice di fenotipo invasivo; in particolare nella maggior parte delle neoplasie del colon una diminuzione dell'espressione di E-caderina è associata ad una prognosi infausta. È da chiarire e meglio investigare il valore prognostico della β-catenina: la maggior parte degli studi a riguardo mostrano una perdita dell'espressione di membrana della proteina a favore dell'espressione nucleare (53).

La molecola CD44 regola le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice e presenta numerose isoforme, differentemente iperespresse in vari tipi di cancro; alcune varianti (come CD44s) risultano alterate nel cancro colorettale, candidandosi come possibili indicatori prognostici.

MATERIALI E METODI

CASISTICA

Nella presente tesi è stata portata avanti la caratterizzazione del carcinoma del colon retto mediante la valutazione di numerosi parametri riguardanti la biologia della neoplasia.

Il progetto di ricerca, di cui il lavoro svolto fa parte, è stato condotto grazie alla collaborazione con la sezione di Clinica e Discipline Chirurgiche del Dipartimento di Area Critica dell'Università degli Studi di Firenze.

Le variabili biologiche studiate sono state analizzate impiegando metodi di cinetica cellulare, di citofluorimetria a flusso, di immunoistochimica e di biologia molecolare.

L'obiettivo finale della ricerca è l'identificazione di fattori capaci di affiancare lo stadio istopatologico nel definire in maniera più precisa la prognosi dei pazienti e quindi esplorare la possibilità di una stadiazione molecolare del tumore colorettale.

Per questo motivo il protocollo di acquisizione dei pazienti prevede il reclutamento di soggetti portatori di cancro sporadico primitivo del colon retto con età massima di 85 anni, sottoposti come prima scelta terapeutica a intervento chirurgico di resezione del tumore e privi di metastasi a distanza diagnosticabili al momento della chirurgia. Sono esclusi, invece, i casi con altre neoplasie maligne pregresse, sincrone o metacrone e quelli che hanno avuto radio o chemioterapia pre-chirurgica.

L'intervento di resezione del tumore colorettale varia con la sede in cui è localizzato il tumore e può essere:

- emicolectomia destra con asportazione del tratto di intestino compreso tra l'ileo terminale e metà del colon trasverso;
- resezione del colon trasverso dalla flessura epatica alla splenica;

- emicolectomia sinistra con asportazione del segmento di colon irrorato dall'arteria mesenterica inferiore;
- resezione anteriore con asportazione di parte del retto, di tutto il sigma e del tratto terminale del colon discendente;
- amputazione addomino-perineale (secondo Miles) con asportazione del sigma, del retto e del canale anale e creazione di un ano preternaturale definitivo;

Nello studio è previsto di valutare parametri che stimano l'attività proliferativa della neoplasia, mediante differenti approcci metodologici, quali la determinazione di Thymidine Labelling Index (percentuale di cellule impegnate attivamente nella sintesi del DNA), Mitotic Index (percentuale delle figure mitotiche), S-Phase Fraction citofluorimetrica (frazione di cellule in fase S), Ki-67 Labelling Index (percentuale di cellule in ciclo). Inoltre, si valutano il grado di ploidia in citofluorimetria a flusso, l'espressione in immunoistochimica di geni correlati con il processo apoptotico *(*p53, bcl-2*)* e con i meccanismi dell'adesione intercellulare *(*β-catenina*)* e la presenza di mutazioni di geni chiave della carcinogenesi colorettale.

Per tutte queste determinazioni è richiesto un prelievo di tessuto tumorale e le dimensioni della lesione neoplastica condizionano il numero di variabili biologiche che possono essere valutate.

La casistica analizzata nella presente tesi è costituita dai pazienti per i quali sono state attualmente eseguite le determinazioni dell'espressione di p53, Bcl-2, β-catenina e Ki-67 in immunoistochimica e la valutazione del contenuto di DNA in citofluorimetria a flusso.

Nella tabella sono riportate le principali caratteristiche clinico-istopatologiche dei 413 pazienti attualmente inclusi nell'analisi.

	Numero	%
Maschi	222	53.8
Femmine	191	46.2
<50	28	6.8
50-59	71	17.2
60-69	162	39.2
≥70	152	36.8
Colon prossimale	128	31.0
Colon distale	122	29.5
Retto	163	39.5
Stadio I	77	18.6
Stadio II	192	46.5
Stadio III	144	34.9
Adenocarcinoma	353	85.5
Adenocarcinoma colloide	60	14.5
G1	8	2.3
G2	324	91.7
G3	21	6.0

Le età media e mediana dei pazienti sono rispettivamente pari a 65.4 e 66 anni (range: 32-82) e si evidenzia una sensibile prevalenza dei soggetti di sesso maschile (53.8%) rispetto a quelli di sesso femminile (46.2%).

La distribuzione per decadi di età mostra la frequenza più elevata nelle classi 60-69 anni (39.2%) e ≥70 (36.8%), in accordo con l'incidenza del tumore colorettale che si manifesta soprattutto nell'età anziana. I pazienti della VI decade sono il 17.2%, mentre al di sotto dei 50 anni è compreso il 6.8% del totale (il 5.8% nella V decade e l'1.0% nella IV).

La maggioranza delle lesioni neoplastiche è localizzata nel retto (39.5%), i carcinomi del colon ascendente e trasverso, definiti come tumori del colon

prossimale, e quelli del colon discendente e del sigma (colon distale) sono rispettivamente il 31.0% e il 29.5% del totale.

La classificazione istologica dei carcinomi del colon retto comprende l'adenocarcinoma e l'adenocarcinoma colloide o mucinoso, quest'ultimo se nel tessuto è presente una componente mucinosa superiore al 50% della massa tumorale. Secondo tale criterio nella casistica attualmente analizzata l'85.5% dei tumori è stato classificato come adenocarcinoma e il 14.5% come adenocarcinoma di tipo colloide.

L'inquadramento prognostico dei tumori maligni prevede la valutazione dello stadio TNM, sistema di classificazione che considera i parametri: T ovvero estensione del tumore primitivo, N coinvolgimento dei linfonodi locoregionali e M presenza di metastasi a distanza. La combinazione delle 3 variabili consente di assegnare ciascun paziente a uno specifico stadio a cui corrisponde una determinata prognosi e che consente di impostare la terapia più appropriata.

Gli stadi I e II comprendono tumori in cui la neoplasia si estende progressivamente nelle strutture dell'organo, ma i linfonodi locoregionali non sono interessati. Allo stadio I appartengono tumori che infiltrano la sottomucosa (T1) e parte della tonaca muscolare (T2), nello stadio II le neoplasie interessano la tonaca muscolare a tutto spessore (T3) e gli organi o le strutture adiacenti all'intestino (T4).

Lo stadio III include i casi in cui i linfonodi locoregionali sono positivi, con qualsiasi valore del parametro T (T1-T4), mentre lo stadio IV è caratterizzato dalla presenza di metastasi a distanza e da qualsiasi valore di T e di N.

In base alla classificazione TNM la maggioranza dei pazienti della casistica rientra negli stadi II (46.5%) e III (34.9%), mentre solo il 18.6% dei casi appartiene alla categoria di lesioni meno estese (stadio I).

Il grado di differenziazione del tumore è un parametro che tiene conto del quadro morfologico cito-architetturale e classifica le neoplasie in 3 categorie: G1, ben differenziata, G2, a differenziazione intermedia e G3, scarsamente differenziata. Per gli adenocarcinomi colloidi il grado di differenziazione non viene valutato. L'attribuzione del grado di differenziazione per il carcinoma del colon retto è caratteristica, in quanto la quasi totalità dei casi è classificata come G2 (91.7%) e le forme G1 e G3 sono rispettivamente solo il 2.3% e il 6.0% del totale.

Come già sottolineato la possibilità di determinare tutte le variabili proposte nel progetto di ricerca dipende principalmente dalle dimensioni della lesione, ma nel caso presente dipende anche dall'evoluzione dello studio che ha incrementato nel tempo il numero di parametri analizzati. Per entrambi i motivi la casistica inserita nella tesi è costituita complessivamente da 413 pazienti, ma le variabili biologiche sono relative a numerosità lievemente diverse: il contenuto di DNA in citofluorimetria a flusso è stato determinato in 407 casi, l'indagine immunoistochimica ha riguardato 351 casi per l'espressione di p53, 361 per Bcl-2, 327 per β-catenina e 342 per Ki-67.

I sottogruppi relativi presentano una composizione, in funzione delle caratteristiche clinico-istopatologiche, del tutto sovrapponibile rispetto alla casistica complessiva.

I frammenti di tessuto tumorale e di mucosa macroscopicamente sana, situata 10 cm a monte rispetto al tumore, da destinare alla determinazione dei parametri biologici, sono prelevati immediatamente dopo la resezione chirurgica e trasportati al laboratorio di Biologia Cellulare e Radiobiologia.

VALUTAZIONE DI P53, BCL-2, β-CATENINA E KI-67 IN IMMUNOISTOCHIMICA

Con il termine immunoistochimica si definisce quell'insieme di tecniche che permettono l'identificazione e la localizzazione su preparati istologici di antigeni in situ mediante l'impiego di anticorpi specifici.

Nel presente studio è stata utilizzata questa tecnica per la valutazione dell'espressione di quattro proteine, p53, Bcl-2, β-catenina e Ki-67, coinvolte rispettivamente nei processi apoptotici, nei meccanismi di adesione intercellulare e nella proliferazione.

Nel protocollo sperimentale utilizzato il tessuto viene fissato per 24 ore in formalina (formaldeide al 4% tamponata a pH 7.6), disidratato attraverso una serie di alcool a titolo crescente e successivamente sottoposto a diafanizzazione in xilolo e ad inclusione in paraffina. Dal blocchetto ottenuto in seguito all'inclusione vengono eseguite al microtomo due sezioni di 4 μm di spessore che sono fatte aderire su vetrini portaoggetto, trattati precedentemente con APES (3-aminopropyl-triethoxy-silano).

Alle due sezioni viene applicata la stessa procedura fatta eccezione per l'anticorpo primario con il quale ne viene trattata una sola; l'altra fornisce quindi il controllo della negatività dei reagenti.

Le sezioni sono sottosposte a sparaffinatura in xilolo per 30 minuti ed in seguito ad idratazione mediante alcool a titolo decrescente (100, 95, 80, 50%); al termine dei passaggi i vetrini sono mantenuti in PBS (Phosphate Buffer Saline) a pH 7.4.

I trattamenti successivi, a partire dallo smascheramento dei siti antigenici, differiscono a seconda delle proteine analizzate. Nel caso di p53, Bcl-2 e β-catenina lo smascheramento avviene trattando i vetrini, immersi in tampone a pH 9.0 (DakoCytomation), con un bagnetto termostatato alla temperatura costante di 96°C per 20 minuti.

Per quanto riguarda il protocollo sperimentale per la determinazione immunoistochimica di Ki-67 la procedura di smascheramento è eseguita mediante trattamento con microonde di potenza 800 W per 23 minuti con i preparati immersi in tampone citrato 10 mM a pH 6.0.

Il trattamento con il calore, in entrambe le metodiche, consente lo smascheramento dei siti antigenici attraverso la rottura dei legami crociati che la formalina instaura con il tessuto durante la fissazione (processo di reticolazione).

Una volta terminato il trattamento i preparati sono lasciati raffreddare a temperatura ambiente per 15 minuti, poi lavati in PBS; in seguito si procede alla cerchiatura delle sezioni con Pap Pen, una penna al silicone che deposita un film idrorepellente, in modo da delimitare le sezioni da trattare e permettere l'impiego di volumi molto piccoli dei successivi reagenti.

Durante le varie incubazioni i vetrini sono posti orizzontalmente in vaschette rivestite di carta bibula imbevuta di acqua e coperte in modo da mantenere umido l'ambiente di reazione, evitando l'essiccamento delle sezioni.

Il primo reagente impiegato, DakoCytomation Peroxidase Blocking Reagent, permette l'inattivazione delle perossidasi endogene della cellula, che potrebbero dare origine ad un segnale aspecifico, catalizzando l'ossidazione della DAB. Viene lasciato agire per 5 minuti sui vetrini ed è seguito, poi, da due lavaggi in PBS di 3 minuti ciascuno, prima di aggiungere, solo sulla sezione campione, l'anticorpo primario. La sezione di controllo viene comunque trattata con il diluente specifico per anticorpi per mantenerla idratata.

Per ciascuna proteina da determinare viene utilizzato un anticorpo primario specifico: per Bcl-2 l'anticorpo monoclonale di topo anti Bcl-2 (DakoCytomation, clone 124), per p53 l'anticorpo monoclonale di topo anti p53 (DakoCytomation, clone DO-7), diluiti entrambi 1:50 e tenuti in incubazione per 30 minuti, per β-

catenina l'anticorpo monoclonale di topo anti β-catenina (DakoCytomation, clone β-catenin-1) diluito 1:200 e incubato ugualmente per mezz'ora, per Ki–67 l'anticorpo monoclonale di topo MIB–1 (DakoCytomation) diluito 1:50 e incubato per 1 ora. È fondamentale impiegare ciascun anticorpo primario alla diluizione ottimale poiché soluzioni troppo concentrate possono provocare reazioni aspecifiche (background), mentre concentrazioni troppo basse possono non dare la reazione specifica con l'antigene.

L'anticorpo anti p53 riconosce un epitopo posto all'estremità ammino-terminale della proteina umana, sia wild type che mutata; l'anticorpo anti Bcl-2 riconosce la proteina umana; l'anticorpo anti β-catenina reagisce con la proteina umana e non presenta reazioni crociate con le altre proteine della famiglia (α e γ-catenina).

L'anticorpo anti-Ki-67 riconosce come epitopo un peptide codificato da una sequenza di 62 paia di basi, altamente conservata, del gene Ki–67.

Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario vengono eseguiti altri due lavaggi di 3 minuti ciascuno con PBS. Le sezioni sono poi trattate per 30 minuti a temperatura ambiente con il sistema Envision (DakoCytomation System Labelled Polymer-HRP anti-mouse), contenente l'anticorpo secondario di capra diretto contro le immunoglobuline di topo, al quale è coniugata, tramite un gruppo di sintesi non contenente avidina e biotina, la perossidasi di rafano.

Ultimata questa fase vi sono due lavaggi in PBS di 3 minuti ciascuno, che precedono l'aggiunta del substrato e del cromogeno (DakoCytomation liquid DAB+substrate) per 5 minuti. Un ulteriore rapido lavaggio in PBS precede la fase di controcolorazione tenue (6 minuti) in emallume di Mayer; dopo disidratazione, infine, i preparati sono mantenuti in Hystoclear, montati col balsamo e lasciati asciugare.

I vetrini sono poi osservati e valutati al microscopio, tenendo in considerazione aspetti diversi in funzione della localizzazione e soprattutto del significato che l'espressione delle proteine assume nei tumori del colon retto e nell'epitelio normale.

Le due proteine coinvolte nella regolazione del processo apoptotico, p53 e Bcl-2, hanno una localizzazione rispettivamente nucleare e citoplasmatica. Nell'epitelio intestinale normale tutte le cellule sono negative per p53, mentre Bcl-2 presenta un'espressione caratteristica limitatamente alle cellule del fondo della cripta. La presenza di Bcl-2 nelle cellule del compartimento proliferativo può essere interpretata come un mezzo per evitare l'induzione della morte nelle cellule in attiva proliferazione e garantire il normale rinnovamento cellulare dell'epitelio intestinale.

Per quanto riguarda β-catenina, la mucosa sana mostra un'espressione localizzata a livello di membrana e, talvolta, una debole colorazione citoplasmatica: di entrambe le sedi è necessario tener conto nella valutazione della tonalità dei preparati di tumore.

Nei preparati ottenuti da tessuti tumorali l'espressione delle due proteine p53 e Bcl-2 è stata valutata in base alla proporzione di cellule positive alla immunoreazione, qualora presenti, e all'intensità della reazione immunologica. Si attribuisce un punteggio da 0 (per i casi negativi) a 3 relativamente alla proporzione di tessuto positivo: il punteggio 1 corrisponde a una quota di cellule positive fino al 33% del totale, 2 fino al 66% e 3 quando la proteina è espressa in una frazione di tessuto superiore al 66% del totale. Similmente, per l'intensità di reazione, il punteggio è assegnato suddividendo i preparati in tre categorie, da 1 a 3, in funzione del grado di intensità crescente (basso, medio o elevato). I due score sono poi combinati in uno score totale che deriva dalla somma dei

singoli parametri e, come tale, risulta informativo di entrambi gli aspetti della reazione immunologica.

Per quanto riguarda β-catenina si prendono in esame tre localizzazioni per ogni caso, membranaria (M), nucleare (N) e citoplasmatica (C), e per ogni componente è stato attribuito un valore di score relativo alla proporzione di tessuto positivo e all'intensità di reazione, e, infine, uno score totale, in maniera del tutto analoga alle proteine coinvolte nel processo apoptotico.

La proteina Ki-67, espressa nel nucleo delle cellule in ciclo, fornisce un parametro denominato Ki-67 LI (Labelling Index) che è indice della frazione di crescita di una popolazione cellulare; la valutazione del parametro avviene mediante una stima semiquantitativa della proporzione di cellule tumorali positive nella sezione di tessuto esaminata.

CONTENUTO DI DNA IN CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO

La citofluorimetria è una tecnica che misura le caratteristiche della cellula in rapporto alle sue dimensioni, alla sua architettura interna e alla presenza di uno o più marcatori fluorescenti.

Il citofluorimetro a flusso analizza campioni di particelle microscopiche in sospensione liquida, attraverso misure di tipo ottico, sfruttando fenomeni di diffusione della luce (light scattering) e di fluorescenza.

Il principio su cui si fonda questa tecnica è quello della focalizzazione idrodinamica che consiste nell'iniettare la sospensione cellulare in un circuito idraulico con sezione variabile fino ad un orifizio di uscita, in un regime di flusso laminare. In tal modo le cellule sono progressivamente allineate e costrette a percorrere singolarmente una traiettoria ben definita, fino al punto d'intersezione con il fascio di luce di eccitazione.

Nello strumento circola una soluzione salina isotonica (sheathfluid), non fluorescente, batteriostatica e fungicida che "inguaina" laminarmente la

sospensione cellulare mantenendola allineata al centro della camera di flusso. La camera ha dimensioni tali da permettere il passaggio solo di singole cellule e non di aggregati, per questo è importante filtrare i campioni o porre un filtro all'imboccatura del sistema di aspirazione al fine di evitare ostruzioni che potrebbero determinare variazioni nella fluidica della macchina. La mancanza, infatti, di un flusso continuo e stabile permetterebbe la precipitazione dei sali con conseguente blocco dello strumento.

Nella cella di misura le cellule intersecano uno o più fasci di luce di lunghezza d'onda specifica generando una serie di segnali:

- di tipo fisico, legati alla morfologia della cellula;
- di fluorescenza, dovuti ad autofluorescenza o alla presenza di fluorocromi introdotti dall'operatore.

I segnali fisici sono il Side Scatter (SSC o Scatter a 90°), determinato da riflessione e rifrazione della radiazione incidente e proporzionale alla granularità cellulare e alla complessità della particella e il ForwardScatter (FSC), determinato dalla diffrazione della radiazione incidente, osservabile ponendosi lungo il percorso laser-cellula e funzione del diametro, della forma e dell'omogeneità cellulare.

I segnali di fluorescenza si ottengono quando nel campione sono presenti sostanze fluorescenti (fluorocromi) che, eccitate da luce monocromatica di idonea lunghezza d'onda, sono in grado di emettere una radiazione di energia inferiore (quindi di lunghezza d'onda maggiore e frequenza minore) nel tempo di alcuni microsecondi.

Ogni fluorocromo presenta una caratteristica banda di lunghezze d'onda per l'eccitazione e per l'emissione e quando si usano più fluorocromi contemporaneamente le loro emissioni devono essere sufficientemente distanti in modo da essere selezionate con filtri ottici e misurate ciascuna

singolarmente. L'intensità della fluorescenza emessa dalla cellula dipende dal numero di siti di legame per il fluorocromo: maggiore è il numero di siti di legame e maggiore sarà l'intensità della radiazione emessa.

L'applicazione della citofluorimetria all'analisi del contenuto di DNA permette di ricavare parametri che si riferiscono alla percentuale di cellule nelle varie fasi del ciclo e in particolare l'aliquota di cellule in fase di sintesi del DNA, parametri che misurano la durata del ciclo cellulare e delle sue fasi e quelli che misurano la frazione complessiva di cellule proliferanti, la velocità di proliferazione e la perdita cellulare.

Tra i fluorocromi per il DNA vi sono quelli intercalanti delle basi, che si legano al DNA stechiometricamente e la quantità di fluorescenza da loro emessa è proporzionale al colorante legato e, quindi, al contenuto di DNA della cellula.

In questo gruppo i più impiegati nella citometria a flusso sono i derivati fenantridinici bromuro di etidio (EB) e ioduro di propidio (PI).

L'unico svantaggio dei coloranti fenantridinici è costituito dal meccanismo di legame che non consente la specificità assoluta per il DNA. PI riconosce qualsiasi coppia di basi e quindi è in grado di legare anche l'RNA a doppia elica (tipicamente t-RNA). L'analisi del DNA con PI e EB, perciò, richiede un trattamento per la digestione enzimatica dell'RNA.

Per quanto riguarda le caratteristiche spettrali, PI ha una larga banda d'assorbimento nel visibile con massimo nel verde, ma è eccitato anche nel blu e ha un'altra banda in UV che consente una discreta eccitazione con la riga a 365 nm del mercurio. PI viene, perciò, utilizzato sia con strumenti a laser (argon) che con quelli a lampada. Lo spettro di emissione è localizzato nel rosso, con massimo a 610 nm.

Il Laboratorio di Biologia Cellulare e Radiobiologia dell'Università di Firenze ha in dotazione un citofluorimetro a flusso FACScan Becton Dickinson con un laser

ad argon di 15 mWatt di potenza, raffreddato ad aria. Il laser ad argon ha una riga di emissione principale nel blu (488 nm) e una nel verde (515 nm).

I campioni da sottoporre ad analisi citofluorimetrica sono ottenuti allestendo una sospensione cellulare monodispersa a partire da un'aliquota del pezzo operatorio.

A tale scopo il tessuto tumorale è disaggregato in un tampone a pH 7.6 contenente citrato trisodico 40 mM, saccarosio 250 mM, dimetilsolfossido (DMSO) al 5%. Le cellule della mucosa sana, ricavate tramite scraping dell'epitelio, sono raccolte nello stesso tampone.

Le due sospensioni ottenute sono filtrate attraverso una membrana di nylon con pori di diametro 50 µm in grado di trattenere gli aggregati cellulari e, in seguito, per ciascuna sospensione si calcola la concentrazione di cellule mediante conteggio in camera di Bürker, dopo adeguata diluizione e colorazione con Trypan Blue.

Per ogni caso si allestiscono tre campioni: uno di tumore e uno di mucosa, contenenti entrambi 10^6 cellule, e un campione misto, con cellule tumorali e cellule standard di riferimento (della mucosa) in rapporto 2:1.

Questi sono centrifugati a 300 g per cinque minuti; successivamente il pellet è liberato dal sovranatante per eliminare i detriti cellulari e sottoposto al trattamento con tre soluzioni.

Inizialmente si aggiungono ad ogni campione 500 µl della prima soluzione a pH 7.6 contenente (60):

- tripsina porcina (T-0134 Sigma) 30 mg/l
- soluzione stock (citrato sodico 3.4 mM; spermina tetraidrocloruro1.5 mM; tampone TRIS 0.5 mM; Nonidet P40 0.1%).

L'azione della tripsina sulle proteine di membrana, citoscheletriche e nucleari è quella di creare delle microporazioni che permettano l'ingresso dello ioduro di

propidio; la spermina ha la funzione di stabilizzare la cromatina e, infine, il Nonidet è un detergente che solubilizza i lipidi di membrana.

La prima soluzione si lascia agire per dieci minuti al termine dei quali al campione si aggiungono 400 µl di una seconda soluzione a pH 7.6, contenente:

- inibitore della tripsina 500 mg/l
- ribonucleasi A 100 mg/l
- soluzione stock.

L'inibitore della tripsina arresta la digestione proteica da parte dell'enzima e consente di conservare l'integrità cellulare necessaria per le successive analisi, mentre la ribonucleasi A ha la funzione di eliminare le molecole di RNA a doppio filamento, eventualmente presenti, alle quali il fluorocromo potrebbe legarsi e quindi rende la colorazione specifica solo per il DNA.

Trascorsi i dieci minuti di trattamento con la seconda soluzione, al campione si aggiungono 500 µl di una terza soluzione, contenente:

- ioduro di propidio 416 mg/l
- spermina tetraidrocloruro 1.16 mg/l
- soluzione stock.

Lo ioduro di propidio si lega al DNA in maniera progressiva fino al raggiungimento di un plateau. Durante il tempo di colorazione, che deve essere almeno di due ore affinché al DNA si leghi una quantità massima e stabile di fluorocromo, i campioni sono mantenuti alla temperatura di 4°C e schermati dalla luce a causa della fotosensibilità del colorante.

Per la successiva lettura citofluorimetrica non è necessario sottoporre il campione a lavaggio per eliminare il colorante libero, poiché, l'emissione di quello legato è 50-100 volte superiore rispetto a quella del colorante in soluzione. Ciò è dovuto all'ambiente fortemente idrofobico presente all'interno della doppia elica in grado di spostare lo spettro di assorbimento e aumentare,

quindi, l'efficienza quantica del colorante. Prima della lettura, però, è necessario che i campioni siano passati attraverso un filtro con pori di 50 µm di diametro per evitare la presenza di aggregati cellulari che potrebbero ostruire l'orifizio del citofluorimetro. Di ogni campione sono letti 30000 eventi.

I dati ottenuti sono interpretati alla luce di due aspetti: la distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo e la presenza di cellule con contenuto di DNA anomalo. Con quest'ultima analisi è possibile evidenziare a livello del genoma anomalie di tipo quantitativo (con variazioni che devono interessare almeno il 4% del DNA totale), ma non anomalie di tipo qualitativo.

Lo strumento rappresenta la distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo tramite un istogramma di distribuzione di frequenza, ottenuto in funzione della fluorescenza emessa e, quindi, del contenuto di DNA.

Nella lettura del grafico tipico di una popolazione diploide si rileva la presenza di due picchi, in corrispondenza di valori di fluorescenza uno doppio dell'altro, relativi rispettivamente alle cellule in fase G_2/M e a quelle in G_0/G_1. La porzione di grafico compresa tra i due picchi è relativa alle cellule in fase S, che presentano livelli di fluorescenza continui, crescenti e intermedi.

Se il campione contiene più cloni cellulari a diverso contenuto di DNA ogni popolazione avrà la sua distribuzione e si potranno avere conseguentemente anche picchi sovrapposti.

L'analisi del ciclo è effettuata da una work-station collegata al citofluorimetro, costituita da un PC Apple Macintosh Power Mac G4, dotato del sistema operativo Mac OSX.

Il PC registra gli eventi come punti di una distribuzione di frequenza, con una risoluzione selezionabile tra 256 e 1024 canali. Attraverso l'istogramma si valuta il numero di eventi che si accumulano per ciascun canale.

Il parametro che esprime la qualità degli istogrammi è il coefficiente di variazione (CV) del picco G_0/G_1, che si ricava dal rapporto percentuale tra la deviazione standard e il valore medio del contenuto di DNA del picco. CV è indice della dispersione dei valori d'intensità di fluorescenza che può essere dovuta a imprecisioni nel sistema di misura, a inconvenienti legati all'allestimento dei campioni o alla variabilità intrinseca della popolazione stessa.

È possibile, inoltre, correlare l'area del segnale di fluorescenza e l'ampiezza dell'impulso con un diagramma di dispersione a punti (dot plot) grazie ad una funzione dello strumento detta "modulo di discriminazione dei doppietti", che permette di distinguere, in fase di misura, i segnali provenienti da cellule monodisperse da quelli degli aggregati.

Attraverso una procedura definita "gating" si sceglie la popolazione cellulare da analizzare, delimitando l'opportuna regione del dot-plot tramite una sorta di "cancello elettronico" che abilita solo gli eventi selezionati a entrare nel sistema di analisi dei dati. Così è possibile escludere gli aggregati, oltre ad eventuali detriti presenti nella sospensione e responsabili del fondo.

L'analisi della distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare è eseguita con il software ModFit™ (Verity Software House) che consente di valutare sospensioni in cui sono presenti più di due cloni non diploidi.

Il grado di ploidia della popolazione esaminata si ricava dal confronto con uno standard diploide di riferimento ed è calcolato come il rapporto tra il canale modale di fluorescenza del picco G_0/G_1 della popolazione in esame e quello del picco G_0/G_1 dello standard di riferimento diploide. Il parametro che si ottiene è il DNA Index (DI), sulla base del quale si assegna il grado di ploidia delle cellule del campione.

RISULTATI

L'analisi del contenuto di DNA in citofluorimetria a flusso è stata eseguita per 407 dei 413 pazienti reclutati nello studio.

Gli istogrammi risultanti, oltre a fornire la distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare, dalla quale si ottiene il parametro SPF (S-phase fraction) che rappresenta la percentuale della popolazione con contenuto di DNA intermedio tra quello delle cellule in fase G_0/G_1 e quello delle cellule in fase G_2/M, consentono di valutare la presenza nel campione di cloni con differente contenuto di DNA.

L'analisi è resa possibile grazie all'allestimento per ciascun caso di un campione misto, costituito dalla sospensione cellulare in esame e dalla sospensione cellulare derivante dalla mucosa sana dello stesso paziente, in cui le cellule relative sono in rapporto 2:1. Inoltre, la risoluzione dei picchi relativi alle popolazioni con differente contenuto di DNA è condizionata dal coefficiente di variazione del picco G_0/G_1 diploide. Nel presente studio i valori medio e mediano di CV sono rispettivamente pari a 3.7% e 3.4%.

Il software ModFit™ esegue il calcolo del DNA Index (DI) in base al quale si attribuisce il grado di ploidia al campione di tumore. La terminologia applicata per il grado di ploidia si ispira alla Consensus Conference (49) secondo la quale è assegnato per convenzione un DNA Index uguale a 1 alle sospensioni con cellule diploidi, mentre per le popolazioni cellulari con cloni non diploidi oltre al diploide si impiega la classificazione seguente:

NEARDIPLOIDE	$0.80 \leq DI \leq 1.20$ e $\neq 1$
TETRAPLOIDE	$1.90 \leq DI \leq 2.10$
ANEUPLOIDE	$DI > 1$ e $\neq$ da neardiploide e tetraploide
MULTIPLOIDE	presenza di due o più cloni non diploidi

I carcinomi colorettali sono prevalentemente costituiti da popolazioni cellulari non diploidi (59.5%), mentre i tumori diploidi sono il 40.5%.

	N° CASI	**%**
DIPLOIDE	165	40.5
NEARDIPLOIDE	34	8.4
TETRAPLOIDE	27	6.6
ANEUPLOIDE	163	40.1
MULTIPLOIDE	18	4.4

Nella tabella sono riportate le frequenze in base al grado di ploidia; si osserva che la maggior parte dei casi non diploidi rientra nella classe aneuploide (40.1%) e che le altre classi di ploidia costituiscono frazioni molto ridotte della casistica. I carcinomi neardiploidi sono l'8.4%, i tetraploidi sono il 6.6% e i casi con più di un clone non diploide oltre al diploide (multiploidi) sono il 4.4%.

Analizzando la frequenza di tumori diploidi e non diploidi in relazione alle caratteristiche clinico-istopatologiche dei tumori colorettali inclusi nella casistica non si osservano distribuzioni diverse dall'atteso per quanto riguarda il sesso dei pazienti, le decadi di età, lo stadio e il grado di differenziazione della neoplasia e l'espressione di p53 e Bcl-2.

La sede in cui l'adenocarcinoma è localizzato, invece, è caratterizzata da un andamento specifico della variabile grado di ploidia, come appare evidente dalla Fig. 1. I tumori del tratto prossimale del colon sono prevalentemente diploidi (60.3%) con un rapporto osservato/atteso pari a 76/51.1, mentre i non diploidi sono il 39.7% (osservati 50 rispetto a 74.9 attesi). L'andamento si

inverte considerando i carcinomi del tratto distale e del retto che sono in maggioranza non diploidi. Per la sede distale il 69.4% dei casi presenta un profilo di DNA non diploide (osservati 84 vs attesi 71.9), nel retto la classe non diploide rappresenta il 67.5% del totale con 108 tumori osservati rispetto a 95.1 attesi. La differenza tra le distribuzioni osservata e attesa è statisticamente significativa ($p<0.0001$).

Nella tabella di Fig. 1 è possibile osservare quali sono le anomalie della ploidia che presentano le maggiori variazioni in funzione della sede del tumore. Nel tratto distale e nel retto la non diploidia prevale soprattutto per un incremento del numero di casi che rientrano nella classe aneuploide (rispettivamente 49.5% e 48.7% del totale) e in misura minore nella classe tetraploide (8.3% e 6.9% del totale), mentre le frequenze di tumori neardiploidi e multiploidi non sembrano essere determinanti.

I casi diploidi sono il 30.6% nel colon distale e il 32.5% nel retto rispetto a un valore di 60.3% nel tratto prossimale. Le differenze osservato/atteso sono statisticamente significative anche nell'analisi dettagliata ($p<0.0001$).

Il tipo istologico della neoplasia mostra una correlazione con il grado di ploidia: gli adenocarcinomi sono in prevalenza non diploidi (61.2%) con 213 casi osservati rispetto a 206.9 attesi, mentre le forme colloidi hanno un contenuto di DNA diploide nel 50.8% dei casi con rapporto osservato/atteso pari a 30/23.9 (Fig. 2). Per gli adenocarcinomi i tumori diploidi osservati sono 135 rispetto a 141.1 attesi e per i carcinomi colloidi le lesioni non diploidi sono 29 vs 35.1 attese.

La differenza tra le distribuzioni non raggiunge la significatività statistica ($p=0.056$).

Analizzando l'espressione della proteina β-catenina nelle sue localizzazioni a livello della membrana plasmatica, nel nucleo e nel citoplasma delle cellule

tumorali si osserva una prevalenza di carcinomi non diploidi quando la proteina è presente nel nucleo (Fig. 2). I casi non diploidi osservati sono 108 rispetto a 88.2 attesi e costituiscono il 70.1% di tutti i tumori positivi per la β-catenina nucleare, mentre i diploidi sono 46 vs 65.8 attesi (29.9%). Nel gruppo che non esprime β-catenina nel nucleo il 54.4 % dei casi è diploide (92 casi osservati vs 72.2 attesi) e il 45.6% è non diploide (77 casi osservati vs 96.8 attesi).

La differente distribuzione del grado di plodia in relazione all'espressione nucleare di β-catenina è statisticamente significativa ($p<0.0001$).

La presenza di β-catenina nel citoplasma delle cellule tumorali evidenzia una tendenza a ricalcare la correlazione già vista per la localizzazione nucleare con il 60.6% dei casi positivi nel citoplasma che rientrano nella categoria non diploide, mentre nei tumori negativi per la proteina le percentuali di diploidi e non diploidi si equivalgono. Anche in questo caso la differenza di distribuzione è statisticamente significativa ($p<0.05$).

Considerando l'espressione di β-catenina a livello della membrana il 67.9% dei casi negativi è non diploide, mentre per i casi positivi il 43.7% è diploide e il 56.3% non diploide.

Dall'analisi del contenuto citofluorimetrico di DNA delle sospensioni ottenute per disaggregazione meccanica del campione di tessuto tumorale si ottiene la distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare e, in particolare, la frazione di cellule in fase S (SPF) che rappresenta una stima del tasso proliferativo della neoplasia. I valori di SPF sono calcolati mediante modelli matematici computerizzati che possono non essere in grado di risolvere in modo attendibile gli istogrammi di DNA nel caso di popolazioni con differente grado di ploidia e sovrapposizioni più o meno complesse di porzioni degli istogrammi. Nel caso specifico SPF è stata calcolata per tutti i tumori colorettali

della casistica eccetto quattro, quindi l'analisi che segue è relativa a 403 campioni tumorali.

Quando il tumore presenta un profilo di DNA con un clone diploide e uno non diploide è stata considerata la SPF della popolazione quantitativamente prevalente.

I valori di SPF hanno una distribuzione non assimilabile a una normale (test di Kolmogorov-Smirnov, $p<0.01$), per questo nello studio delle relazioni tra il parametro di proliferazione e le categorie definite dai parametri clinico-istopatologici è stata impiegata la mediana e le differenze sono state valutate utilizzando i test non parametrici di Kruskal-Wallis per l'andamento della variabile e di Mann-Whitney per il confronto tra coppie di valori.

I livelli di SPF nella casistica sono ampiamente variabili, con un minimo di 2.1% e un massimo di 62.3%; la media e la mediana sono rispettivamente di 16.9% e 16.0%.

I valori mediani di SPF non presentano variazioni significative in funzione del sesso dei pazienti, delle decadi di età, dello stadio e del grado di differenziazione del tumore.

Nella Fig. 3 è riportata l'analisi della frazione di cellule in fase S in relazione alla sede della neoplasia dalla quale è evidente un incremento dei livelli mediani passando dai carcinomi del tratto prossimale a quelli del colon distale e del retto. L'andamento risulta statisticamente significativo ($p<0.05$).

Gli adenocarcinomi colloidi hanno livelli mediani di SPF significativamente più bassi degli adenocarcinomi che non presentano componente mucinosa ($p<0.005$) (Fig. 3).

L'attività proliferativa del tumore mostra una precisa relazione con il grado di ploidia (Fig. 4). Infatti, i valori mediani di SPF aumentano progressivamente secondo la sequenza diploide, neardiploide, tetraploide, aneuploide e

multiploide con un andamento statisticamente significativo ($p<0.0001$). La differenza è ancora evidente e significativa ($p<0.0001$) se si riuniscono i casi con differente grado di ploidia nella classe non diploide (Fig. 4).

SPF non mostra relazioni significative con l'espressione di p53 e Bcl-2, anche se si osserva una tendenza all'aumento dei valori mediani passando dai casi p53- (SPF=14.0%) ai p53+ (SPF=16.4%).

Considerando la proteina β-catenina, la sua presenza nel nucleo delle cellule tumorali è associata a livelli mediani di SPF significativamente più elevati ($p<0.01$) (Fig. 5).

L'espressione delle componenti di membrana e citoplasmatica, invece, non identifica tumori con caratteristiche particolari di proliferazione.

Nel presente studio il potenziale proliferativo della neoplasia è stato quantificato anche valutando l'espressione della proteina nucleare Ki-67, la cui presenza è indice di percorrenza del ciclo cellulare. La frazione di cellule positive per la reazione immunologica specifica rappresenta la cosiddetta frazione di crescita della popolazione cellulare.

La distribuzione dei valori di Ki-67 Labelling Index (Ki-67 LI) differisce significativamente da una gaussiana (test di Kolgorov-Smirnov, $p<0.01$), per questo nell'analisi delle relazioni tra il parametro di proliferazione e le categorie definite dai parametri clinico-istopatologici è stata impiegata la mediana e le differenze sono state valutate utilizzando i test non parametrici di Kruskal-Wallis per l'andamento della variabile e di Mann-Whitney per il confronto tra coppie di valori, analogamente a quanto è stato riportato per SPF.

Ki-67 LI è stato determinato in 342 casi, i livelli medi e mediani del parametro sono rispettivamente uguali a 63.5% e 67.0% con minimo di 3.0% e massimo di 100.0%.

È da sottolineare che le cellule positive per Ki-67 sono in tutte le fasi del ciclo perché la proteina è espressa dalla G_1 alla mitosi ad eccezione di G_0 e quindi la loro percentuale è più elevata di quella che si riferisce, ad esempio, alle cellule in fase S.

I livelli mediani di Ki-67 LI non variano significativamente nelle categorie delle variabili sesso e decadi di età dei pazienti, sede del tumore, stadio, tipo istologico e grado di differenziazione.

Non si osserva, inoltre, alcuna relazione tra la frazione di crescita e il grado di ploidia, l'espressione di p53 e di Bcl-2.

Per quanto riguarda β-catenina i valori mediani di Ki-67 LI sono significativamente più elevati quando è negativa la componente di membrana ($p<0.01$), quando la proteina è presente nel nucleo ($p<0.01$) e nel citoplasma ($p<0.0001$) delle cellule neoplastiche (Fig. 6).

Si può, quindi, definire un fenotipo con percentuale di cellule in ciclo elevata ed espressione di β-catenina assente sulla membrana e presente nel citoplasma e nel nucleo.

L'immunoreazione per p53 è stata eseguita in 351 dei casi inclusi nello studio.

Nei preparati istologici dei carcinomi colorettali con positività dell'immunoreazione per p53 la valutazione al microscopio ottico evidenzia un precipitato giallo-bruno a livello del nucleo delle cellule neoplastiche.

La positività per la proteina p53 si è registrata nella maggioranza dei carcinomi del colon retto analizzati (80.1%) come si evidenzia nella tabella in cui sono riportati i valori percentuali per le classi positiva/negativa e per le classi di score totale.

	NEG %	POS %	CLASSI DI SCORE TOTALE 2(%)	3(%)	4(%)	5(%)	6(%)
p53	19.9	80.1	11.4	14.6	17.8	16.4	39.8

La maggioranza dei casi (54.8%) presenta più del 66% delle cellule tumorali positive (score 3), mentre i tumori che hanno un numero di cellule positive comprese tra il 34% e il 66% (score 2) sono il 24.6% del totale e nella classe con meno del 34% di cellule positive (score 1) rientra il 20.6% del totale. L'intensità della reazione è massima (score 3) per il 47.0% dei campioni di tessuto, intermedia nel 30.6% e debole nel 22.4%.

Considerando lo score totale, ricavato sommando i singoli score della proporzione e dell'intensità, si osserva che nella classe con score totale 2 rientra la frazione più bassa dei casi (11.4%) e che il 32.4% dei campioni è inserito nel gruppo intermedio in cui lo score totale è 3-4. La maggioranza dei tumori (56.2%) appartiene alle classi 5-6 in cui nessuno dei punteggi singoli è 1.

L'immunoreattività per Bcl-2, localizzata nel citoplasma, è stata rilevata nel 45.7% dei 361 casi di carcinoma colorettale analizzati, come è riportato in tabella.

	NEG %	POS %	CLASSI DI SCORE TOTALE 2(%)	3(%)	4(%)	5(%)	6(%)
Bcl-2	54.3	45.7	31.5	26.6	17.6	18.8	5.5

A differenza di quanto osservato per p53, i tumori con bassa proporzione di cellule positive (score 1) risultano prevalenti e sono il 52.1% del totale. L'intensità dell'immunoreazione è bassa (43.0%) o intermedia (43.7%) nella

quasi totalità dei casi, mentre la quota di neoplasie che presenta intensità della colorazione elevata è solo il 13.3% dei campioni e quella con elevata proporzione di cellule positive è il 21.8%.

Considerando lo score totale, i casi di carcinoma colorettale sono più numerosi nelle classi con score 2-3 (58.1% del totale), mentre sono pressoché equivalenti quelli appartenenti alle classi con score totale 4 (17.6%) e 5 (18.8%). La frazione di tumori con score totale elevato è decisamente bassa (5.5%).

L'espressione di β-catenina è stata valutata in 327 pazienti ed ha riguardato le sue componenti a livello della membrana plasmatica, del citoplasma e del nucleo.

In base a questa suddivisione i casi con positività di membrana sono la maggioranza e rappresentano il 91.4% del totale.

	NEG	**POS**	**CLASSI DI SCORE TOTALE**				
	%	**%**	**2(%)**	**3(%)**	**4(%)**	**5(%)**	**6(%)**
β-cat M	8.6	91.4	8.4	9.7	24.1	41.7	16.1
β-cat N	52.3	47.7	19.2	37.9	26.9	10.9	5.1
β-cat C	32.1	67.9	13.5	18.9	32.9	30.6	4.1

Per quanto riguarda la proporzione di tessuto, il 75.3% dei casi presenta una positività in più del 66% delle cellule neoplastiche (score 3), mentre il rimanente 24.7% dei tumori é quasi equamente ripartito nelle categorie di score 2 (13.7%) e di score 1 (11.0%). L'intensità dell'immunoreazione è prevalentemente medio-bassa: il 34.1% dei tumori ha score 1 e il 48.5% ha score 2, mentre solo il

17.4% delle neoplasie è stato inserito nella classe ad elevata intensità (score 3).

Lo score totale, somma dei due punteggi singoli, assegna l'8.4% delle neoplasie alla classe con score 2, il 9.7% allo score 3 e il 16.1% alla classe con score 6; la maggioranza dei casi è inclusa nelle categorie con score 4 (24.1%) e 5 (41.7%).

L'espressione di β-catenina nel nucleo è stata registrata nel 47.7% dei casi analizzati; la proporzione di cellule tumorali positive è inferiore al 34% (score 1) nel 62.2% dei casi e solo il 12.2% delle lesioni ha una positività nucleare in una quota di tessuto superiore al 66% (score 3). Per quanto riguarda l'intensità della reazione immunologica, la maggioranza dei campioni presenta un valore di score pari a 2 (60.3%), il 17.3% dei tumori esprime una positività di grado elevato (score 3) e il 22.4% ha score 1.

Ne consegue che la distribuzione in funzione delle fasce di score totale riportata in tabella mostra un'alta percentuale di casi nelle classi con score 3 (37.9%) e 4 (26.9%), una frazione minima (5.1%) ha score 6, il 10.9% dei tumori rientra nel gruppo con score 5 e il 19.2% in quello con score 2.

La proteina è presente nel citoplasma delle cellule tumorali del 67.9% dei campioni analizzati; in prevalenza (61.3%) è interessata una quota di tessuto superiore al 66% (score 3), il 22.5% dei tumori ha score 2 e il 16.2% score 1. L'intensità della colorazione è bassa nel 56.3% delle neoplasie, intermedia nel 39.6% e solo il 4.1% dei campioni ha score 3.

Analizzando lo score totale, i tumori si concentrano nelle fasce di score 4 (32.9%) e 5 (30.6%), il 13.5% è incluso nello score 2, il 18.9% nella classe di score totale 3 e il 4.1% rientra nella categoria di score più elevato.

Le relazioni reciproche tra le diverse componenti della β-catenina sono visualizzate nelle tabelle; nella prima sono riportate le percentuali di casi con

espressione citoplasmatica e di membrana in funzione dell'espressione nucleare, nella seconda la relazione tra l'espressione di membrana e quella citoplasmatica.

	β-cat N neg %	**β-cat N pos** %	
β-cat M neg	17.9	82.1	p<0.001
β-cat M pos	55.5	44.5	
β-cat C neg	79.0	21.0	p<0.001
β-cat C pos	39.6	60.4	

L'analisi evidenzia l'associazione tra la mancanza di localizzazione di membrana e la positività nucleare: i casi con nucleo positivo sono l'82.1% dei tumori negativi per la componente di membrana. Nel gruppo positivo per l'espressione a livello della membrana le percentuali di carcinomi negativi e positivi per β-catenina nucleare sono simili (rispettivamente il 55.5% e il 44.5%). La differenza tra la distribuzione osservata e quella attesa è statisticamente significativa (p<0.001).

Per quanto riguarda l'espressione di β-catenina nel nucleo e nel citoplasma, i casi con positività nucleare sono il 60.4% all'interno del gruppo di carcinomi che esprime β-catenina anche nel citoplasma, mentre sono solo il 21.0% del totale nel gruppo con β-catenina citoplasmatica negativa. Valori opposti si evidenziano per le neoplasie senza espressione nucleare che sono il 79.0% all'interno della classe con citoplasma negativo e il 39.6% in quella con positività citoplasmatica. La differenza tra la distribuzione reale e quella attesa è statisticamente significativa (p<0.001).

In sintesi è più frequente dell'atteso che i tumori del colon retto presentino entrambe le componenti negative o positive, ovvero si evidenzia una relazione tra la co-espressione della proteina nel nucleo e nel citoplasma e un'associazione con l'assenza di espressione in entrambe le strutture cellulari.
Se si analizzano le componenti di β-catenina a livello della membrana e nel citoplasma delle cellule tumorali non si osserva alcuna relazione; infatti le percentuali di casi positivi per β-catenina di membrana sono il 94.3% e il 90.1% rispettivamente nella classe con citoplasma negativo e nella classe con citoplasma positivo. I corrispondenti valori per i tumori che hanno la membrana negativa sono 5.7% e 9.9%.

	β-cat M neg %	**β-cat M pos** %	
β-cat C neg	5.7	94.3	
β-cat C pos	9.9	90.1	

L'analisi delle relazioni tra l'espressione di p53, di Bcl-2 e delle componenti di β-catenina e le categorie delle variabili clinico-istopatologiche è stata eseguita dividendo la casistica in tumori negativi e positivi per ciascun marker, in quanto l'introduzione degli score riduce eccessivamente il numero di casi per classe e non consente una valutazione statistica affidabile.
La percentuale di casi positivi e negativi per l'espressione di p53 in funzione delle variabili sesso, decadi di età dei pazienti e localizzazione del tumore non mostra variazioni significative.
La relazione tra p53 e la variabile stadio della neoplasia non è riconducibile a un legame diretto tra l'aspetto biologico e l'estensione del tumore: nel passaggio dallo stadio I allo stadio II si osserva un aumento della percentuale di

casi p53 positivi (rispettivamente pari al 76.2% e all'82.0%) con il corrispondente decremento dei tumori che non esprimono la proteina (rispettivamente il 23.8% e il 18.0%).

Il risultato sembrerebbe indicare che le anomalie riguardanti l'accumulo della proteina sono più frequenti nei casi di malattia più avanzata, ma l'andamento dell'espressione della proteina nei tumori in stadio III non si accorda con questa ipotesi. Infatti, le percentuali di carcinomi p53 positivi (79.3%) e negativi (20.7%) sono intermedie rispetto a quelle registrate nei tumori in stadio I e II. Le distribuzioni osservata e attesa non differiscono in maniera statisticamente significativa.

Per quanto riguarda l'analisi delle relazioni con il rimanente delle variabili clinico-istopatologiche, si segnala soltanto l'assenza di positività per p53 in 4 (66.7%) dei 6 casi con elevata differenziazione (G1), mentre nelle classi G2 e G3 i tumori p53 positivi sono rispettivamente l'81.5% e l'84.2%. Si sottolinea, tuttavia, che il 91.7% dei tumori inseriti nello studio sono a differenziazione intermedia e che il risultato è condizionato dalla bassa numerosità dei casi G1 e G3.

La frequenza di carcinomi con espressione di Bcl-2 non presenta variazioni significative in relazione al sesso e alle decadi di età dei pazienti e alla sede della neoplasia.

La positività per Bcl-2, proteina anti-apoptotica, espressa normalmente dalle cellule del fondo delle cripte intestinali, è decisamente legata all'estensione della neoplasia e la distribuzione osservata differisce in maniera statisticamente significativa ($p<0.05$) da quella attesa (Fig. 7).

Infatti, tra i tumori in stadio I i casi Bcl-2 positivi sono il 59.4% e i negativi il 40.6%, nelle classi II e III, invece, si osserva un progressivo aumento dei

carcinomi negativi (rispettivamente il 55.6% e il 59.4%) a scapito di quelli esprimenti la proteina che sono il 44.4% nello stadio II e il 40.6% nello stadio III.
L'espressione di Bcl-2 in funzione delle altre variabili clinico-istopatologiche, tipo istologico e grado di differenziazione, e del grado di ploidia dimostra una sovrapposizione quasi perfetta tra le distribuzioni osservata e attesa.
Correlando il pattern di espressione di p53 e di Bcl-2 non si osserva alcuna relazione: la frequenza osservata di casi positivi e negativi per le due proteine è esattamente quella attesa.
L'analisi delle frequenze dei casi β-catenina positivi e negativi nelle classi dei parametri clinico-istopatologici è riportata solo per la componente nucleare, vista l'elevata proporzione di carcinomi che esprimono la proteina a livello della membrana e nel citoplasma.
L'espressione della proteina nel nucleo delle cellule tumorali non correla con il sesso e le decadi di età dei pazienti, lo stadio e il grado di differenziazione della neoplasia.
In funzione della sede del tumore i casi con positività nucleare per β-catenina sono il 34.9% dei tumori con sede nel colon prossimale, situazione che si inverte considerando le neoplasie del colon distale dove si registra la presenza della proteina nel nucleo in una proporzione di tumori pari al 61.2%. L'andamento è intermedio per i carcinomi localizzati nel retto con una positività nucleare nel 48.0% dei casi.
In maniera speculare variano, ovviamente, i casi negativi con valori del 65.1% per i tumori del tratto prossimale, del 38.8% nel colon distale e del 52.0% nel retto. La differenza tra la distribuzione reale e quella attesa non è statisticamente significativa (p=0.06).
In funzione del tipo istologico (Fig. 8), si osserva che i carcinomi mucinosi o colloidi sono più frequentemente β-catenina nucleare negativi (68.3%) rispetto

ai tumori senza componente colloide che risultano negativi nel 50.0%. Le forme che esprimono la proteina nel nucleo sono rispettivamente il 31.7% e il 50.0% e le differenze sono statisticamente significative ($p<0.05$).

L'analisi di β-catenina nucleare in relazione al grado di ploidia mostra un andamento statisticamente significativo ($p<0.0001$) (Fig. 8), in cui si evidenzia una prevalenza di carcinomi negativi per l'espressione della proteina nelle classi diploide (66.7%) e tetraploide (68.2%). I tumori neardiploidi, aneuploidi e multiploidi risultano, invece, in maggioranza positivi per β-catenina con percentuali rispettivamente pari a 52.4%, 64.3% e 53.8%.

Il rapporto tra β-catenina e grado di ploidia si mantiene simile anche raggruppando i casi in due sole classi, diploide e non diploide: l'assenza della proteina nel nucleo riguarda il 66.7% dei carcinomi diploidi, mentre la presenza di espressione nucleare si osserva nel 58.4% dei tumori non diploidi ($p<0.0001$).

Per quanto riguarda l'espressione di p53 e β-catenina nucleare non si evidenzia alcuna relazione, mentre l'analisi della positività per Bcl-2 e β-catenina nel nucleo delle cellule tumorali dimostra una prevalenza dei casi positivi per Bcl-2 quando è positiva β-catenina nucleare (52.9%) e una maggioranza di tumori negativi per Bcl-2 se β-catenina è negativa (57.5%). La differenza tra la distribuzione osservata e quella attesa è statisticamente significativa ($p<0.05$).

La caratterizzazione biologica dei tumori maligni umani è finalizzata sia alla raccolta di informazioni sul fenotipo neoplastico, sia alla verifica del possibile significato predittivo di prognosi delle variabili determinate. Quest'ultimo obiettivo ha la ricaduta più importante dal punto di vista pratico, in quanto può fornire strumenti utili in campo clinico ai fini della personalizzazione delle scelte terapeutiche. Tuttavia è anche il più difficile da raggiungere, poiché è

necessario raccogliere, analizzare e tenere in osservazione per tempi lunghi un numero molto elevato di casi.

In primo luogo si è proceduto alla verifica dell'andamento della prognosi in funzione dello stadio che costituisce, attualmente, il principale determinante prognostico.

Il modello statistico impiegato è quello di Kaplan e Meier (61) che valuta la probabilità di sopravvivenza libera da malattia (Disease Free Survival, DFS) e la probabilità di sopravvivenza globale (Overall Survival, OS) nei gruppi di pazienti definiti dalle variabili clinico-istopatologiche o biologiche.

Attualmente i 413 pazienti inseriti nello studio presentano un tempo medio di osservazione (follow up) pari a 55.1 mesi con una mediana di 50.6 mesi.

Durante il follow up si sono registrate 102 riprese di malattia (81 metastasi a distanza, 21 recidive locali) e 71 decessi per progressione della neoplasia.

Nella Fig. 9 è riportato l'andamento delle probabilità di DFS e di OS in funzione dello stadio della neoplasia.

Per quanto riguarda la probabilità di DFS le curve relative ai pazienti in stadio I, II e III mostrano un andamento progressivamente decrescente del parametro indice delle riprese di malattia locale e a distanza in funzione del tempo di osservazione dopo la chirurgia.

In particolare nel gruppo di pazienti con tumore in stadio I si sono presentati 9 eventi di ripresa di malattia su 77 pazienti con un livello di probabilità di DFS di 84.9% entro 114 mesi; per i pazienti in stadio II le riprese di malattia sono state 40 su 191 casi e la probabilità di DFS a 140 mesi è 57.6%; nello stadio III si sono verificati 53 eventi negativi su 145 pazienti con un livello di DFS pari a 57.3% entro 114 mesi di follow up.

Le differenze tra i tre gruppi sono statisticamente significative ($p<0.0001$) ed è interessante sottolineare che le curve relative ai casi con tumore in stadio II e III

mostrano una pendenza molto diversa nella prima parte delle osservazioni, mentre si attestano su valori simili quando il follow up supera i 10 anni. I tumori in stadio più avanzato (stadio III) sono caratterizzati da una frequenza più elevata di riprese di malattia entro un periodo di tempo breve dall'intervento chirurgico rispetto ai tumori in stadio II.

Nella Fig. 9 in basso è riportata la probabilità di OS in funzione dello stadio che mostra un andamento simile a DFS fino a 120 mesi di follow up: le curve relative sono decrescenti con l'aumentare dello stadio e le differenze sono statisticamente significative ($p<0.0001$).

Nel dettaglio, per i casi in stadio I si sono verificati 7 decessi su 77 pazienti con un livello di OS pari a 70.3% a 140 mesi, nel gruppo in stadio II le morti per malattia sono state 26 su 191 casi e la probabilità di OS a 140 mesi è del 59.6%, per i tumori più avanzati (stadio III) si sono registrati 38 decessi su 145 casi con OS=62.4% sempre entro 140 mesi.

Le curve di OS mostrano come quando il follow up dei pazienti supera i 10 anni si verifichino alcuni eventi negativi tardivi, soprattutto nello stadio I e nello stadio II, che sembrano limitare il valore predittivo di prognosi dello stadio.

La conseguenza diretta dell'effettivo ruolo prognostico della stadiazione anche nella casistica inclusa nel presente studio è rappresentata dalla necessità di suddividere i pazienti in base allo stadio prima di eseguire l'analisi della sopravvivenza in funzione di qualsiasi parametro aggiuntivo.

Nelle figure che seguono sono riportati i risultati dell'analisi per alcuni dei parametri biologici valutati nella ricerca suddividendo la casistica nei tre stadi del tumore.

Nella Fig. 10 si osserva l'andamento della probabilità di disease free survival per i casi con carcinoma in stadio I, II e III in funzione del contenuto di DNA

della neoplasia. Nell'analisi i tumori con grado di ploidia diverso dal diploide sono stati raggruppati nell'unica classe di lesioni non diploidi.

Per i pazienti con tumore in stadio I le curve relative ai tumori diploidi e non diploidi sono quasi sovrapposte con livelli di probabilità di DFS rispettivamente pari a 86.9% e 82.8% entro 120 mesi di follow up. Gli eventi di ripresa di malattia sono 3 su 33 casi nel gruppo di tumori diploidi e 6 su 41 pazienti nel gruppo dei tumori non diploidi.

Nello stadio II l'andamento della probabilità di DFS è coincidente fino a 110 mesi, quando la curva delle neoplasie non diploidi mostra un sensibile decremento: i valori di DFS sono 75.8% a 110 mesi (14 eventi su 77 casi) per i tumori diploidi e 42.5% entro 140 mesi (26 eventi su 114 casi) per i non diploidi.

Per lo stadio III la probabilità di DFS decorre sovrapposta nei due gruppi con carcinoma diploide e non diploide e i livelli di probabilità di DFS a 100 mesi sono rispettivamente 58.6% e 57.6%. Gli eventi di ripresa di malattia sono 19 su 55 pazienti per i tumori diploidi e 32 su 87 casi per i non diploidi.

Nella Fig. 11 è rappresentata la probabilità di OS in funzione del grado di ploidia nei singoli stadi. Per i casi con tumore in stadio I a 120 mesi di follow up i livelli di OS sono inferiori nel gruppo con tumore non diploide (DFS=93.8% per i diploidi e DFS=52.8% per i non diploidi), ma la differenza è condizionata dalla bassa numerosità di casi nel momento in cui si verifica l'ultimo decesso e non è statisticamente significativa. I decessi sono 1 su 33 casi con tumore diploide e 6 su 41 pazienti con neoplasia non diploide.

Un andamento analogo si registra nel gruppo con carcinoma in stadio II e il fenomeno è simile anche nella localizzazione temporale degli eventi negativi che condizionano i livelli di OS per i casi non diploidi: due decessi si verificano dopo 10 anni di follow up e provocano un sensibile riduzione della probabilità di OS (OS=42.4% a 140 mesi) rispetto a quella registrata per i tumori diploidi

(OS=84.9% a 140 mesi), ma la differenza non risulta statisticamente significativa. Per i tumori diploidi si verificano 8 decessi su 77 pazienti, mentre nel gruppo non diploide i decessi sono 18 su 114 casi.

Nello stadio III la probabilità di OS è simile per i tumori diploidi e non diploidi, i livelli del parametro a 110 mesi di follow up sono rispettivamente pari a 58.2% (13 decessi su 55 casi) e 64.4% (24 decessi su 87 casi).

I parametri di proliferazione determinati nel presente studio, SPF e Ki-67 LI, sono variabili continue per le quali è necessario stabilire un valore di cut off quando si voglia verificarne il possibile significato prognostico.

In via preliminare i valori mediani dei due parametri sono stati impiegati per condurre un'analisi esplorativa delle relazioni con il decorso della malattia neoplastica.

Per quanto riguarda Ki-67 LI i livelli della variabile esprimente la frazione di cellule in ciclo non discriminano, nell'ambito di pazienti omogenei per stadio, casi con prognosi differente.

Si riporta, a titolo di esempio, nelle Figg. 12 e 13, l'analisi relativa a SPF in cui è stato impiegato come cut off il suo valore mediano nella casistica, pari a 16.0%.

Osservando la Fig. 12 i casi con tumore in stadio I mostrano livelli di DFS più elevati per valori di SPF del tumore inferiori o uguali a 16.0%, ma la differenza non è statisticamente significativa. Nel dettaglio le riprese di malattia sono 2 su 37 casi per SPF≤16.0% (probabilità di DFS a 110 mesi pari a 92.8%) e 7 su 37 casi per SPF>16.0% (probabilità di DFS a 110 mesi uguale a 77.0%).

Nel gruppo in stadio II l'andamento delle curve relative ai casi con differente SPF è molto simile fino a 110 mesi di follow up, successivamente la probabilità di DFS diminuisce sensibilmente per i pazienti con tumore a elevata proliferazione, senza che, però, la differenza sia statisticamente significativa.

I livelli di DFS entro 114 mesi sono pari a 71.6% (22 eventi negativi su 98 casi) per valori di SPF≤16.0%, mentre nel gruppo con SPF superiore a 16.0% la probabilità di DFS entro 140 mesi è il 44.6% (18 eventi negativi su 92 casi).
La situazione è opposta nello stadio III in cui i livelli di probabilità di DFS sono più elevati nel gruppo di pazienti con tumore ad alta proliferazione. Le riprese di malattia sono 27 su 68 casi per valori di SPF inferiori o uguali al cut off (probabilità di DFS=49.8% entro 100 mesi) e 23 su 71 casi quando la SPF è maggiore del 16.0% (probabilità di DFS=64.6% entro 100 mesi). La differenza tra i due gruppi non è statisticamente significativa.
L'andamento della probabilità di OS (Fig. 13) è simile a quello di DFS in tutti e tre gli stadi. Nello stadio I i decessi sono 2 su 37 casi per SPF≤16.0% (OS=89.8% a 125 mesi) e 5 su 37 per SPF>16.0% (OS=54.9% a 125 mesi).
Per i tumori in stadio II si registrano 16 decessi su 98 pazienti quando SPF è minore o uguale al cut off (OS=78.3% a 140 mesi) e 10 decessi su 92 casi quando i livelli di SPF sono maggiori del 16.0% (OS=45.2% a 140 mesi).
Nella classe di neoplasie in stadio III si evidenzia una probabilità di OS più elevata nel gruppo con tumore a SPF>16.0%: i decessi sono 16 su 71 pazienti con OS pari a 69.1% entro 110 mesi di follow up. La probabilità di OS è, invece, uguale a 55.5% entro lo stesso periodo di tempo con 20 decessi su 68 pazienti per valori di proliferazione inferiori al cut off.
Le differenze in tutti e tre gli stadi non sono statisticamente significative.
Le variabili biologiche p53 e Bcl-2 non hanno evidenziato alcuna relazione con la prognosi dei pazienti portatori di adenocarcinoma colorettale.
Per quanto riguarda l'espressione di β-catenina, la frequenza di casi positivi sulla membrana plasmatica e nel citoplasma delle cellule tumorali è talmente elevata da rendere impossibile una valutazione statisticamente attendibile del

significato prognostico. La localizzazione nucleare, invece, discrimina gruppi di pazienti con numerosità simile.

L'analisi della probabilità di DFS e di OS in funzione della presenza di β-catenina nucleare nei gruppi definiti dallo stadio è riportata nelle Figg. 14 e 15.

La probabilità di DFS (Fig. 14) nel gruppo di tumori in stadio I è più elevata per i casi che non esprimono la proteina nel nucleo: le riprese di malattia sono 2 su 31 casi β-catenina negativi (DFS=90.4% a 120 mesi) e 4 su 27 casi β-catenina positivi (DFS=78.4% a 120 mesi).

Per lo stadio II le curve risultano quasi sovrapposte per tutto il periodo di osservazione, gli eventi negativi sono 15 su 81 pazienti per β-catenina non espressa (DFS=73.7% a 114 mesi) e 16 su 70 casi con positività per β-catenina (DFS=72.3% a 114 mesi).

Nel gruppo di pazienti con tumore in stadio III i livelli più elevati di probabilità di DFS sono presentati dai casi con espressione nucleare della proteina (DFS=71.5% entro 100 mesi) e la differenza rispetto ai tumori negativi (DFS=46.7% entro 100 mesi) è statisticamente significativa ($p<0.01$). Le riprese di malattia sono 26 su 61 casi β-catenina nucleare negativa e 15 su 60 casi con espressione della proteina.

L'andamento delle curve di sopravvivenza globale (Fig. 15) è condizionato dal basso numero di decessi registrati nello stadio I in cui i livelli di OS a 125 mesi sono pari a 47.9% (2 decessi su 31 casi) nel gruppo con espressione nucleare della proteina e pari a 85.9% (2 decessi su 27 casi) nello stesso periodo di osservazione per il gruppo negativo. In particolare i pazienti con tumore positivo per la reazione immunologica presentano un caso di morte per malattia dopo 10 anni di follow up, quando il numero complessivo di pazienti in osservazione è ridotto e questo determina una diminuzione elevata della probabilità di OS.

Nel gruppo in stadio II la probabilità di OS è più bassa quando il tumore esprime β-catenina nel nucleo, anche se la differenza tra i due gruppi, positivo e negativo, non è statisticamente significativa (Fig. 15). I decessi sono 6 su 81 casi per i pazienti in cui la neoplasia è negativa per β-catenina (probabilità di OS=88.9% entro 100 mesi) e 11 su 70 casi per i tumori con espressione nucleare della proteina (probabilità di OS=78.1% entro 100 mesi).

L'andamento di OS nello stadio III è analogo a quello di DFS: si osserva un'inversione della probabilità di OS che è significativamente più elevata per i casi β-catenina positivi ($p<0.05$) (Fig. 15). I livelli di OS nel gruppo negativo per la proteina sono pari a 53.1% a 110 mesi di follow up (18 decessi su 61 casi), mentre per i tumori con espressione nucleare di β-catenina la probabilità di OS entro lo stesso periodo di tempo è pari a 78.3% (10 decessi su 60 casi), valore simile a quello registrato per i pazienti β-catenina positivi dello stadio II.

Nell'analisi si è esplorata la possibilità di accoppiare alcune delle variabili biologiche studiate in modo da proporre un eventuale profilo molecolare del carcinoma colorettale utile ai fini di una stima più precisa della prognosi rispetto allo stadio TNM, ma con lo stadio come fattore prognostico guida.

Se si combinano i profili di espressione delle proteine Bcl-2 e β-catenina nucleare osserviamo che i pazienti in stadio II sono suddivisi in due gruppi con differente andamento della probabilità di OS (Fig. 16).

I casi Bcl-2 negativi presentano livelli simili di OS nei due gruppi con diversa espressione di β-catenina, negativo (6 decessi su 47 pazienti, probabilità di OS=82.3% entro 100 mesi) e positivo (4 decessi su 34 pazienti, probabilità di OS=82.5% entro 100 mesi).

Per Bcl-2 espressa nel citoplasma delle cellule tumorali l'andamento della OS accentua quello già osservato solo per l'espressione di β-catenina nucleare nello stadio II e le differenze tra le due curve di sopravvivenza sono

statisticamente significative ($p<0.05$). I casi negativi per β-catenina sono 32 e nessuno è deceduto per malattia (probabilità di OS=100% a 100 mesi), quelli che esprimono la proteina sono 35 e 6 sono morti per progressione del tumore entro lo stesso periodo di osservazione (probabilità di OS=76.8%).

Nella Fig. 17 è riportata l'analoga analisi eseguita per i casi con tumore in stadio III: sia i tumori negativi sia quelli positivi per Bcl-2 mantengono un andamento di probabilità di OS che sembra determinato dall'espressione di β-catenina. Per i pazienti Bcl-2 negativi i decessi sono 11 su 40 quando β-catenina nucleare è negativa (OS=53.6% entro 100 mesi) e 5 su 29 quando la proteina è positiva (OS=77.1% entro 100 mesi).

Nel gruppo positivo per Bcl-2 l'andamento delle curve è simile, ma le differenze tra i livelli di OS sono più accentuate e statisticamente significative ($p<0.05$).

In dettaglio i decessi sono 7 su 20 casi per β-catenina nucleare negativa (probabilità di OS=53.5% a 100 mesi) e 5 su 31 casi per β-catenina nucleare positiva (probabilità di OS=79.2% a 100 mesi).

DISCUSSIONE

La comprensione delle modalità con cui la cellula neoplastica realizza il programma di crescita, acquisisce la capacità di invadere il tessuto in cui si sviluppa e produce metastasi a distanza costituisce il punto di partenza per ottenere un migliore controllo della malattia ed assicurare al paziente una qualità di vita più soddisfacente.

Le alterazioni molecolari degli eventi che scandiscono la vita della cellula normale possono suggerire il modo per ripristinare tali funzioni.

Le proposte derivanti da questo approccio spesso non portano all'immediata realizzazione degli obiettivi, perché il trasferimento delle acquisizioni della ricerca in campo clinico richiede tempi anche molto lunghi.

I processi studiati e sui quali si concentrano gli interessi dei ricercatori per proporre modalità alternative di controllo o di neutralizzazione dell'aggressività dei tumori riguardano in particolare la complessa serie di eventi che concorrono a deregolare la crescita di una popolazione cellulare, quindi l'attività proliferativa, la morte cellulare programmata, i meccanismi di riparazione dei danni al DNA, l'influenza e i rapporti con il microambiente, come controparte con la quale interagisce il tumore durante le fasi di crescita e di diffusione, ma anche l'apporto di nutrienti alle cellule tumorali e i meccanismi attraverso i quali si realizza la metastatizzazione.

Lo studio dei processi biologici può contribuire a migliorare la possibilità di cura delle neoplasie maligne mediante la ricerca e la validazione di parametri capaci di discriminare classi di tumori con diverso potenziale di aggressività e, quindi, contribuire a definire il profilo prognostico dei pazienti e/o predirne la risposta a specifici agenti terapeutici.

Questi parametri, da associare a quelli clinico-istopatologici, che attualmente guidano la programmazione terapeutica, potrebbero aggiungere informazioni utili per la selezione dei pazienti da sottoporre alle terapie adiuvanti post-chirurgiche e contribuire alla personalizzazione del trattamento.

I fattori clinico-istopatologici accreditati di significato prognostico hanno fornito strumenti irrinunciabili per il corretto inquadramento dei pazienti, ma hanno anche dimostrato i loro limiti. La stadiazione, infatti, consente di fare una previsione attendibile della probabilità di controllo della neoplasia e dell'aspettativa di vita del malato; è evidente, però, che pazienti con tumori della stessa sede e con lo stesso stadio possono presentare una differente prognosi e rispondere in modo diverso allo stesso trattamento terapeutico.

La caratterizzazione biologica della neoplasia rappresenta un settore che potrebbe fornire marker capaci di discriminare gruppi di pazienti che possono trarre vantaggio da un trattamento adiuvante, rispetto ad altri in cui la terapia non è necessaria.

Gli studi con questa finalità hanno riguardato parametri di proliferazione, citogenetici, biochimici (marker tumorali ed altri) e di biologia molecolare.

Tuttavia, il percorso per proporre nuovi fattori, prognostici o predittivi di risposta alla terapia, richiede una serie di verifiche che coinvolgano il laboratorio e la componente clinica. È necessario, innanzitutto, che la determinazione sia standardizzata e che l'informazione fornita sia validata a livello nazionale ed internazionale.

Tra i parametri che hanno superato i protocolli di validazione vi sono quelli relativi alla proliferazione cellulare e tra questi l'indice di marcatura ha dimostrato di soddisfare i requisiti del fattore prognostico con documentata utilità a livello clinico.

L'aggressività del tumore è legata alla sua attività proliferativa, pur con l'influenza di numerosi fattori (tempo di ciclo cellulare, frazione di crescita, frazione di cellule perdute per differenziazione o morte, angiogenesi, etc.) che condizionano la reale velocità di crescita della massa tumorale.

Per alcune neoplasie maligne (vescica, laringe, ovaio, linfomi), e soprattutto per il carcinoma della mammella, casistiche molto numerose hanno permesso di evidenziare la capacità prognostica del 3H-Thymidine Labelling Index (TLI) e hanno contribuito alla sua introduzione nella programmazione della terapia adiuvante post-chirurgica.

Nel caso delle pazienti con tumore della mammella (quasi esclusivamente T_1 e T_2), i dati raccolti da questo gruppo di ricerca, in alcune centinaia di casi, con un valore di cut off di TLI del 3.1% hanno permesso di discriminare il gruppo con attività proliferativa significativamente più elevata e rischio di morte 1.9 volte superiore. Nella classe con linfonodi negativi il rischio di progressione dei casi con elevata proliferazione della neoplasia è 3.1 volte più alto rispetto a quello delle pazienti con tumore a bassa proliferazione.

I risultati di studi multicentrici hanno evidenziato la necessità di sottoporre le pazienti N^- con tumore ad elevata attività proliferativa a chemioterapia adiuvante post-chirurgica (62-70).

Il gruppo di ricerca ha valutato anche l'attività proliferativa di altri tumori solidi umani, tra i quali i carcinomi della laringe trattati solo con chirurgia, in cui il TLI è capace di discriminare i pazienti con tumore ad elevata attività proliferativa (>16.3%) e rischio relativo di decesso pari a 11.8 (71).

Per i pazienti con carcinoma superficiale della vescica urinaria (pT_a-pT_1) il rischio di recidiva è 6.4 volte superiore quando il TLI è >5.0%. I risultati hanno dimostrato, inoltre, che il trattamento endovescicale con BCG fornisce un

significativo vantaggio (incremento della probabilità di DFS) solo nei soggetti in cui l'attività proliferativa del tumore è più elevata (72-74).

La presente tesi riguarda la caratterizzazione biologica degli adenocarcinomi del colon retto. La prognosi dei pazienti affetti da questa neoplasia, nonostante i progressi della tecnica chirurgica e le potenziali maggiori possibilità di fare una diagnosi precoce, è rimasta pressoché invariata negli ultimi anni. La ripresa di malattia per neoplasia colorettale, infatti, si verifica nel 40-45% dei pazienti nei 5 anni successivi all'intervento chirurgico per la lesione primitiva, con un picco di maggiore frequenza nei primi 18-24 mesi.

Nessuna delle classificazioni basate sull'estensione della neoplasia in sede locale e a distanza finora proposte è in grado di discriminare tutti i pazienti a prognosi favorevole da quelli a prognosi infausta.

Il carcinoma del colon retto riveste un ruolo che si può considerare paradigmatico delle linee di tendenza e delle informazioni che si sono ottenute a livello clinico-istopatologico e biomolecolare. Nel campo della diagnostica isto-patologica, infatti, si sta percorrendo la strada della discriminazione di aspetti morfologici differenziati in modo da aggiungere elementi alla previsione del decorso della malattia e questo atteggiamento è, per certi aspetti, opposto rispetto all'introduzione dei sistemi di stadiazione. Si è passati dalla sintesi delle diverse caratteristiche dei pazienti e delle neoplasie in categorie con prognosi il più possibile simile, all'analisi dei singoli profili morfo-strutturali per identificare differenti modalità di evoluzione della malattia neoplastica, diverse probabilità di risposta alle terapie e cercare, così, di personalizzare l'intervento terapeutico.

Nella ricerca a livello cellulare e molecolare si riscontra un atteggiamento che ha portato alla scomposizione di fenomeni complessi in una moltitudine di molecole, di interazioni tra di esse, di geni coinvolti fino a perdere di vista il contesto generale. Tali conoscenze contribuiscono alla comprensione dei

meccanismi di controllo e di regolazione dei processi coinvolti nella carcinogenesi e nella progressione delle neoplasie, ma difficilmente il singolo passaggio o la singola molecola si candidano come determinanti dell'evoluzione della malattia.

Attualmente si sta cercando una sorta di ricomposizione degli elementi acquisiti e delle modalità di interazione dei vari processi in modo da sintetizzarne l'effetto e valutare se ad esso corrisponde una possibilità di discriminazione, con una ricaduta per il paziente in termini di possibilità di controllo e/o cura della neoplasia.

In questo senso non si ricercano i fattori che singolarmente potrebbero essere utili ai fini della previsione della gravità della malattia, ma si valutano profili complessi, quali i meccanismi di controllo della proliferazione, dell'apoptosi, dei processi di angiogenesi, di adesione intercellulare, di migrazione. È in atto un tentativo volto a descrivere il cancro nella sua eterogeneità, nella molteplicità delle vie di segnalazione coinvolte e nell'eventuale possibilità che gli effetti siano modulabili.

L'obiettivo finale è l'elaborazione di una stadiazione molecolare da affiancare a quella clinico-istopatologica (37).

I risultati ottenuti dalla ricerca di base hanno consentito di conoscere molti dei meccanismi attraverso i quali la cellula neoplastica acquisisce il fenotipo tumorale e che ne determinano il destino, hanno definito in modo sempre più preciso i rapporti con il microambiente, le interazioni con cellule e tessuti vicini, hanno chiarito gli effetti di fattori ambientali, genetici e riguardanti lo stile di vita sull'insorgenza della malattia e hanno permesso di comprendere in parte o in toto la modalità di azione degli strumenti terapeutici a disposizione e di gettare le basi per nuove strategie. La possibilità di correggere gli eventi direttamente

alla fonte, cioè nel genoma, e l'impiego delle cellule staminali sono due dei fronti più stimolanti aperti negli ultimi anni.

Il Laboratorio di Biologia Cellulare e Radiobiologia è impegnato da tempo nell'analisi di numerose variabili biologiche, relative alla neoplasia colorettale, con lo scopo di verificarne il potenziale predittivo di prognosi.

Studi pregressi hanno messo a punto e valutato l'espressione di Bcl-w in adenomi e in adenocarcinomi. Bcl-w è membro della famiglia di Bcl-2 e codifica una proteina con attività anti-apoptotica, simile a quella di Bcl-x_L.

Negli adenomi del colon retto la proteina è espressa molto raramente, così come negli adenocarcinomi di mammella, stomaco e cervice uterina. Negli adenocarcinomi colorettali Bcl-w è espressa nella quasi totalità dei casi. Il tentativo di correlare l'intensità della reazione immunologica con l'espressione della proteina evidenzia livelli più elevati nei casi con linfonodi positivi ($p<0.02$) rispetto ai negativi e nello stadio III ($p<0.009$) rispetto allo stadio I (75). Nel carcinoma colorettale, Bcl-w sembra essere coinvolta nella progressione da adenoma ad adenocarcinoma, con un potenziale significato prognostico ancora tutto da verificare.

È stato valutato anche il ruolo delle proteine Id (helix-loop-helix, HLH) come regolatori della crescita e della differenziazione cellulare (76).

La deregolazione dell'espressione dei geni Id è in grado di promuovere la proliferazione e, in idonee condizioni fisiologiche, di indirizzare verso l'apoptosi. Inoltre, numerose linee di cellule neoplastiche, nonché alcuni tumori umani, presentano un aumento dei livelli di espressione delle proteine Id. Nella casistica analizzata l'immunoreattività per Id1, Id2 e Id3 dei carcinomi è significativamente superiore rispetto a quanto evidenziato nella mucosa sana e negli adenomi. L'espressione di Id1 e di Id2 è correlata direttamente con l'attività proliferativa e con l'immunoreattività per p53.

Il reclutamento dei pazienti del presente studio si caratterizza per il fatto che gli interventi chirurgici sono stati eseguiti dallo stesso operatore e che la valutazione clinico-strumentale delle condizioni dei pazienti durante il follow up è stata sempre effettuata dallo stesso gruppo. La casistica è, quindi, molto omogenea e non risente di variabili, quali le eventuali differenze nella procedura chirurgica e nel tipo di trattamento.

Il protocollo di reclutamento prevede una serie di criteri di selezione dei pazienti: sono inclusi solo i casi affetti da adenocarcinoma colorettale primitivo, sottoposti, in prima istanza, ad intervento di resezione chirurgica radicale a scopo curativo e sono esclusi tutti i pazienti che abbiano ricevuto una terapia sistemica o locale pre-operatoria. Sono esclusi, inoltre, i casi con altre neoplasie maligne pregresse, sincrone o metacrone ed è stabilito un massimo di età di 85 anni. Infine, sono reclutati solo pazienti con malattia estesa in sede locale e sono esclusi quelli che al momento dell'intervento chirurgico presentano metastasi a distanza, requisito quest'ultimo indispensabile per disporre di una casistica adeguata allo scopo della ricerca, cioè la valutazione di parametri biologici predittivi di prognosi.

È necessario, infatti, che i pazienti abbiano un'aspettativa di vita e che siano in grado di sopportare le eventuali terapie sistemiche previste dai protocolli clinici. I casi metastatici ab initio hanno una prognosi sfavorevole già al momento della diagnosi e non sono idonei per studi prognostici, in quanto devono necessariamente essere sottoposti a terapie molto aggressive.

Nel presente studio sono attualmente inclusi 413 pazienti con i requisiti richiesti nel protocollo di acquisizione e per i quali il decorso della malattia è stato monitorato nel tempo successivo all'intervento chirurgico.

Le variabili biologiche determinate sui campioni di tessuto tumorale sono: il contenuto di DNA in citofluorimetria a flusso che fornisce i parametri grado di

ploidia, indice della presenza di cloni cellulari con assetto citogenetico anomalo, e SPF, ovvero la frazione di cellule in fase S del ciclo cellulare, l'espressione in immunoistochimica della proteina Ki-67 marker della frazione di cellule in ciclo, l'espressione di p53 e Bcl-2, implicate nell'apoptosi e l'espressione di β-catenina, proteina coinvolta nei meccanismi di adesione intercellulare ed esponente della via di segnalazione Wnt.

L'analisi dei risultati consente di definire alcune delle caratteristiche dell'adenocarcinoma colorettale.

Un'elevata percentuale dei tumori del colon retto presenta un anomalo contenuto di DNA (59.5% del totale) e il dato correla con la riportata instabilità genetica che si instaura durante la carcinogenesi.

I tumori diploidi prevalgono nel tratto prossimale, mentre i carcinomi con sede nel colon distale e nel retto sono in maggioranza non diploidi; gli adenocarcinomi di tipo colloide sono più frequentemente diploidi rispetto agli adenocarcinomi che non presentano alcuna componente mucinosa.

Il grado di ploidia mostra, inoltre, una correlazione con l'espressione di β-catenina nelle sue componenti a livello delle cellule tumorali: i casi non diploidi sono prevalenti quando la proteina è presente nel nucleo, nel citoplasma e assente sulla membrana plasmatica.

Nello studio sono stati valutati due indici di proliferazione che si riferiscono a frazioni di cellule in differenti fasi del ciclo cellulare: SPF valuta la percentuale di cellule nella fase di sintesi del ciclo, mentre Ki-67 LI stima la quota di cellule che percorrono effettivamente il ciclo.

I due parametri mostrano una variabilità molto ampia nella casistica e presentano correlazioni diverse con le variabili clinico-istopatologiche.

I tumori del colon retto sono caratterizzati da livelli mediani di SPF crescenti passando dalla sede prossimale alla distale e al retto; gli adenocarcinomi

colloidi presentano valori di SPF più bassi rispetto agli adenocarcinomi ed inoltre l'attività proliferativa stimata dal parametro citofluorimetrico aumenta in modo caratteristico passando dalle forme diploidi alle neardiploidi, tetraploidi, aneuploidi e multiploidi.

Non si evidenziano, invece, relazioni tra SPF e le variabili clinico-istopatologiche, quali sesso e decadi di età dei pazienti, stadio e grado di differenziazione del tumore e tra SPF e i parametri biologici, quali l'espressione di p53 e di Bcl-2.

La frazione di cellule in fase S è significativamente più elevata nei casi in cui β-catenina è presente nel nucleo delle cellule tumorali.

Per quanto riguarda Ki-67 LI, l'unica correlazione osservata è relativa all'espressione di β-catenina: i valori mediani della frazione di crescita sono più alti quando è negativa la componente di membrana e quando la proteina è presente nel nucleo e nel citoplasma delle cellule neoplastiche.

L'immunoreazione per p53 si è rivelata positiva nell'80.1% dei casi analizzati, in accordo con l'ipotesi che le alterazioni a livello genico e/o del turnover della proteina siano eventi tardivi nel processo di carcinogenesi.

L'espressione di p53 presenta deboli correlazioni con lo stadio del tumore, in quanto i casi positivi per la proteina aumentano passando dalle lesioni in stadio I a quelle in stadio II, ma non aumentano se si considerano le neoplasie in stadio III.

La positività citoplasmatica per Bcl-2, proteina anti-apoptotica, espressa normalmente dalle cellule del fondo delle cripte intestinali, si è registrata nel 45.7% dei casi sottoposti all'indagine e la frequenza di tumori positivi è decisamente legata all'estensione della neoplasia. Infatti i casi positivi sono prevalenti nello stadio I e diminuiscono progressivamente nello stadio II e nel III, con un corrispondente incremento delle forme in cui Bcl-2 non è espressa.

Per quanto riguarda β-catenina, l'immunoreattività è stata valutata a livello dei compartimenti cellulari in cui la proteina si localizza e cioè sulla membrana plasmatica, nel citoplasma e nel nucleo delle cellule tumorali.
Infatti, in condizioni alterate della via di segnalazione Wnt o in conseguenza di anomalie proprie della proteina, il suo normale turnover è compromesso e si osserva una traslocazione nel nucleo, dove β-catenina esplica la funzione di attivatore della trascrizione di geni fondamentali per proliferazione e apoptosi.
Nei campioni sottoposti all'analisi il 91.4% è risultato positivo per la componente di membrana, il 47.7% ha mostrato la localizzazione nucleare e il 67.9% ha presentato positività nel citoplasma.
Le tre localizzazioni di β-catenina sono correlate in quanto si evidenzia un'associazione tra la negatività della componente di membrana e la positività nucleare e tra l'espressione nel nucleo e quella nel citoplasma. Viceversa, non si osserva alcuna relazione tra le componenti di membrana e citoplasmatica.
La localizzazione di β-catenina nel nucleo è più frequente nelle neoplasie del colon distale (61.2%) rispetto a quelle del tratto prossimale (34.9%), mentre i tumori del retto presentano una percentuale di positività intermedia (48.0%).
I carcinomi colloidi sono prevalentemente negativi per l'espressione della proteina nel nucleo rispetto agli adenocarcinomi senza componente colloide.
I tumori con β-catenina nucleare negativa sono prevalenti tra le lesioni diploidi e tetraploidi, mentre un andamento opposto, con la maggioranza dei casi positivi, si registra nei carcinomi neardiploidi, aneuploidi e multiploidi.
Analizzando le possibili relazioni tra le variabili biologiche si osserva che l'espressione di β-catenina nel nucleo correla con la positività per Bcl-2.
L'obiettivo del presente studio è costituito dalla verifica del significato predittivo di prognosi delle variabili biologiche determinate. Per procedere alla valutazione, in primo luogo, è stato analizzato l'andamento della sopravvivenza

libera da malattia e della sopravvivenza globale in funzione dello stadio del tumore, che costituisce il fattore prognostico principale per i pazienti con carcinoma colorettale.

Come ci si aspettava la casistica mostra un andamento progressivamente decrescente delle probabilità di DFS e di OS all'aumentare dell'estensione della neoplasia, ovvero dello stadio. È da sottolineare che il tempo di follow up dei casi inseriti nello studio è lungo, con valori medio e mediano rispettivamente di 55.1 e 50.6 mesi. Questo fa sì che alcuni dei pazienti siano in osservazione anche da più di 10 anni e che si siano verificati eventi negativi (decessi) tardivi, ma rigorosamente imputabili a progressione della malattia, che sembrano limitare le capacità predittive di prognosi dello stadio.

Tuttavia, visto che il ruolo dello stadio nel predire l'evoluzione della neoplasia è confermato anche nella casistica in studio, si è necessariamente dovuto procedere a un'analisi in funzione dei parametri biologici, separando i singoli stadi.

Introducendo come fattore discriminante il grado di ploidia si osserva una modesta differenza di probabilità di OS nei pazienti in stadio I e II, con livelli più bassi del parametro per i casi con tumore non diploide.

L'attività proliferativa, stimata come SPF del tumore, è una variabile continua che implica la scelta di un livello di cut off per suddividere i casi nelle classi a bassa e ad alta proliferazione. Nell'analisi condotta è stato scelto come cut off di SPF il suo valore mediano nella casistica.

Le curve delle probabilità di DFS e di OS mostrano una tendenza simile per i casi in stadio I e II: i livelli più bassi dei parametri di sopravvivenza sono relativi alla categoria di tumori con SPF superiore al cut off, anche se le differenze sono molto modeste.

Nei tumori in stadio III l'andamento è opposto con i valori più elevati di probabilità di DFS e di OS per i pazienti in cui la neoplasia ha alta attività proliferativa.
Il risultato contrastante per questa classe potrebbe essere dovuto al fatto che i casi in stadio III sono tutti sottoposti a terapia sistemica adiuvante e che la responsività al trattamento è maggiore se l'attività proliferativa è elevata.
Gli altri parametri biologici non mostrano capacità discriminanti in relazione alla prognosi dei pazienti, ad eccezione dell'espressione nucleare di β-catenina.
Nei gruppi in stadio I e II si osservano livelli di probabilità di DFS e di OS di poco inferiori per i casi con espressione nucleare della proteina, mentre nei tumori in stadio III i pazienti con β-catenina nucleare positiva hanno prognosi significativamente migliore.
Il dato che emerge dall'analisi è un coinvolgimento dell'espressione nucleare della molecola con la progressione della malattia neoplastica; tuttavia la suddivisione della casistica per stadio e per espressione del marker biologico non consente una valutazione definitiva dal punto di vista statistico.
L'inversione che si evidenzia nello stadio III è correlabile con il ruolo di β-catenina come attivatore della trascrizione di geni importanti per la proliferazione e per l'apoptosi. Infatti, i due processi influenzano la risposta al trattamento terapeutico a cui sono sottoposti i pazienti con tumore in stadio avanzato.
Nel presente studio è stata, inoltre, esplorata la possibilità di definire un fenotipo più aggressivo combinando più marker biologici, anche se il numero di casi per categoria non è ancora del tutto sufficiente.
Nei pazienti con tumore in stadio II, abbinando a β-catenina nucleare l'espressione di Bcl-2, si definisce un gruppo Bcl-2 negativo in cui la probabilità di OS non si diversifica in relazione alla presenza o meno di β-catenina; nei casi

positivi per Bcl-2, invece, si accentua la differenza di OS con un livello significativamente più elevato per i pazienti con β-catenina negativa. Il fenotipo con peggiore prognosi sembra essere quello positivo per Bcl-2 e per β-catenina.

Nello stadio III l'introduzione dell'espressione di Bcl-2 non cambia l'andamento già visto: i casi con β-catenina nel nucleo presentano in entrambi i gruppi la prognosi migliore.

In conclusione, i risultati del presente studio indicano che l'associazione tra variabili biologiche multiple può contribuire a definire in modo più preciso la prognosi dei pazienti con adenocarcinoma colorettale, anche se tale approccio impone numerosità delle casistiche molto elevate.