

POSTER TUMORI RENALI E RICERCA DI BASE

P74

IDENTIFICAZIONE DI CELLULE RENALI NORMALI E TUMORALI CON PROPRIETÀ STAMINALI E PROGENITRICI

S. Bombelli, C. Bianchi, L. Invernizzi, P. Brambilla, R. Perego, G. Bovo, G. Cattoretti, M. Casu, G. Strada (Milano)

SCOPO DEL LAVORO:

Un'ipotesi interessante sulla patogenesi dei tumori è quella secondo cui essi potrebbero originare da "cellule staminali tumorali" che hanno accumulato mutazioni in grado di alterarne le capacità proliferative e di autorinnovamento e che potrebbero costituire quella piccola popolazione cellulare che assicura la crescita tumorale anche dopo i trattamenti antineoplastici. Lo scopo di questo lavoro è identificare e caratterizzare le cellule staminali del carcinoma renale (RCC) e della controparte normale al fine di identificare nuovi marcatori specifici del RCC, una neoplasia caratterizzata da una prognosi severa ed in cui solo l'intervento chirurgico nelle fasi precoci risulta essere un'efficace terapia.

MATERIALI E METODI:

Per l'isolamento di cellule staminali da rene normale e carcinoma renale è stato utilizzato un approccio funzionale. Le cellule ottenute dopo digestione del tessuto normale e neoplastico con collagenasi sono state coltivate a bassa densità in un terreno specifico serumfree DMEMF12, con l'aggiunta di B27, EGF e bFGF2, su piastre non aderenti per formare "nefosfere" in sospensione. È stata calcolata l'efficienza di formazione delle sfere (SFE) come rapporto tra il numero di sfere ottenute e il numero di cellule piastrate. Per individuare all'interno delle "nefosfere" la presenza di cellule quiescenti e quindi con proprietà staminali, le cellule sono state marcate prima della piastratura con un colorante fluorescente lipofilico (PKH). Sulle cellule che compongono le sfere è stata effettuata una caratterizzazione fenotipica valutando l'espressione di alcuni marcatori di staminalità ed epiteliali mediante immunofluorescenza su vetrino dopo cytopsin e mediante FACS.

RISULTATI:

Dopo 12 giorni dalla piastratura otteniamo "nefosfere" primarie dal tessuto renale normale (SFE=0,5%) e tumorale (SFE=1,5%). Una volta dissociate a singole cellule e ripiastrate nelle stesse condizioni di coltura, le sfere primarie, sia normali che tumorali, sono in grado di rigenerare in 10 giorni sfere secondarie (SFE=0,6%). Le sfere contengono una popolazione di cellule quiescenti, che mantengono il colorante PKH e quindi più intensamente fluorescenti, e una meno intensamente fluorescente. Inoltre osserviamo cellule positive per i marcatori epiteliali Citocheratina e ECaderina, e cellule positive per i marcatori staminali CD24 (positività 90%), CD44 e CD133.

DISCUSSIONE:

Le "nefosfere" ottenute da tessuto renale normale e neoplastico contengono una popolazione di cellule quiescenti, quindi con proprietà staminali, e una popolazione di cellule in attiva replicazione già "committed" verso una linea differenziativa, con proprietà di progenitori, come dimostrato dall'espressione di marcatori epiteliali e staminali nelle cellule che compongono le sfere.

MESSAGGIO CONCLUSIVO:

La definizione delle differenze tra cellule staminali normali e tumorali potrà essere utile per una migliore comprensione della patogenesi del RCC e per l'individuazione di marker specifici e di nuovi target terapeutici.

P75

L'ENZIMA NICOTINAMIDE NMEITRASFERASI POTENZIALE MARCATORE DIAGNOSTICO E PROGNOSTICO NEL CARCINOMA RENALE

G. Milanese, G. Muzzonigra, D. Sartini, V. Rossi, V. Pozzi, A. Filosa, R. Montironi, M. Emanuelli (Ancona)

SCOPO DEL LAVORO:

Allo scopo di valutare il coinvolgimento degli enzimi del metabolismo dei farmaci nel carcinoma renale, abbiamo analizzato l'espressione tissutale dell'enzima Nicotinamide Nmetiltrasferasi (NNMT) nel carcinoma renale, nell'oncocitoma e nei rispettivi tessuti sani adiacenti.

MATERIALI E METODI:

In 50 pazienti sottoposti a nefrectomia per neoplasia renale monolaterale non metastatica abbiamo valutato retrospettivamente l'espressione immunostochimica di NNMT sia nel tessuto neoplastico sia nel tessuto sano proveniente dallo stesso paziente. Di ogni paziente abbiamo considerato: l'età, il sesso, il tipo istologico, il grado istologico (sec. Fuhrman), le dimensioni tumorali, lo stadio tumorale (TNM 2002) e la sopravvivenza cancerspecifica. L'espressione immunostochimica di NNMT è stata valutata sia come percentuale di cellule positive alla colorazione dopo incubazione con anticorpi specifici, sia come intensità di colorazione citoplasmatica.

RISULTATI:

20 pazienti presentavano un carcinoma renale a cellule chiare, 14 un carcinoma papillifero, 8 un carcinoma cromofobo e 8 un oncocitoma. I carcinomi renali comprendevano 20 pT1, 8 pT2 e 14 pT3. Il carcinoma a cellule chiare ed il papillifero mostravano un significativo aumento della espressione di NNMT rispetto al corrispettivo tessuto sano, mentre nel carcinoma cromofobo e nell'oncocitoma l'espressione dell'enzima non variava tra tessuto tumorale e tessuto sano. L'espressione di NNMT nel tessuto sano (valutata sia come percentuale di cellule positive sia come intensità della colorazione citoplasmatica) risultava simile tra il gruppo con cancro e il gruppo di pazienti con oncocitoma (p=0,210; p=0,174, rispettivamente). Analizzando l'espressione dell'enzima solo nel tessuto tumorale, il carcinoma a cellule chiare ed il papillifero mostravano un livello di espressione simile tra loro, e significativamente maggiore rispetto al cromofobo e all'oncocitoma.

Nel gruppo di pazienti con carcinoma renale, un'elevata percentuale o un'elevata intensità di espressione di NNMT tissutale si associavano ad una ridotta sopravvivenza cancerspecifica (log rank: 10,1; p=0,0015 e log rank: 8,42; p=0,0149, rispettivamente).

DISCUSSIONE:

L'unica strategia efficace nella cura delle forme neoplastiche localizzate del carcinoma renale è rappresentata dall'approccio chirurgico. La resistenza alla chemioterapia e alla radioterapia di tale neoplasia è causa di elevata mortalità nelle forme localmente avanzate e metastatiche e gli enzimi coinvolti nel

metabolismo dei farmaci possono giocare un ruolo chiave nella progressione del carcinoma renale. In questo studio abbiamo dimostrato che nelle forme più aggressive di carcinoma renale esiste un'iper-espressione tissutale di NNMT, mentre nelle forme a bassa aggressività e nell'oncocitoma l'enzima sembra essere scarsamente espresso.

MESSAGGIO CONCLUSIVO:

Abbiamo dimostrato per la prima volta che l'enzima NNMT è un interessante marcatore diagnostico e prognostico del carcinoma renale.

P76

LE ALTERAZIONI DEL GENE VHL PROMUOVONO LA PROGRESSIONE TUMORALE NEL CARCINOMA RENALE A CELLULE CHIARE INTRACAPSULARE MEDIANTE LA LOCALIZZAZIONE NUCLEARE DEL HIF1 ALFA

A. Minervini, C. Di Cristofano, C. Della Rocca, M. Menicagli, F. Lessi, G. Bertacco, A. Covazzano, G. Bevilacqua, G. Salnitri, R. Minervini, S. Serni, A. Lopini, M. Carini (Firenze)

SCOPO DEL LAVORO:

Le alterazioni del gene VHL inibiscono l'abilità delle pVHL di legarsi a HIF1alfa con conseguente iperespressione di HIF1alfa. L'espressione di HIF1alfa è regolata dal livello di O2. In condizioni normali di ossigeno pVHL lega HIF1alfa, dopo idrossilazione nell'ODD (oxygen-dependent degradation domain) e questo permette la degradazione di HIF1alfa. In questo dominio è localizzato un SNP (single nucleotide polymorphism) al codone 582. In condizioni di ipossia, l'interazione VHL/HIF1alfa viene abolita e HIF1alfa attiva i suoi geni target a livello nucleare. Lo scopo dello studio è stato di caratterizzare lo stato molecolare di VHL e del SNP di HIF1alfa in una ampia popolazione di ccRCC intracapsulari. Inoltre abbiamo valutato l'impatto prognostico delle alterazioni geniche di VHL e HIF1alfa e dei loro prodotti proteici.

MATERIALI E METODI:

Sono stati studiati 136 pazienti con ccRCC intracapsulare (pT1a, pT1b, pT2), età media 62 anni, sottoposti a nefrectomia radicale nel periodo 1991-2001. Followup medio 117 mesi. Per lo studio immunostochimico è stato costruito un tissue microarray e sono stati utilizzati due anticorpi monoclonali anti pVHL (clone Ig32 e clone Ig33) e un anticorpo policlonale anti HIF1alfa. Sono state eseguite inoltre l'analisi mutazionale dell'intero gene VHL, la valutazione del SNP (C1772T) di HIF1alfa, l'analisi dello stato di metilazione del promoter di VHL e LOH (loss of heterozygosis) al locus 3p25 di VHL. I risultati sono stati correlati con la sopravvivenza tumore specifica.

RISULTATI:

Le alterazioni del gene VHL sono state evidenziate nel 57% dei casi. Le mutazioni di VHL, metilazione e LOH sono state evidenziate nel 51%, 11% e 17% dei casi. I pazienti con alterazioni bialleliche di VHL hanno evidenziato una riduzione statisticamente significativa della sopravvivenza tumore specifica (p=0,01). Abbiamo evidenziato inoltre una associazione statisticamente significativa tra alterazione biallelica di VHL, l'assenza di espressione di pVHL (p=0,004) e la localizzazione nucleare di HIF1alfa (p=0,04). SNP era associato con la sola localizzazione citoplasmatica di HIF1alfa (p=0,007). La negatività di pVHL (p=0,001) e la positività nucleare di HIF1alfa (p=0,005) erano statisticamente correlate con una minore sopravvivenza tumore specifica.

DISCUSSIONE:

La valutazione dell'impatto prognostico delle mutazioni di VHL ha evidenziato risultati contrastanti e pochi studi hanno analizzato le alterazioni di HIF1alfa nel ccRCC. Le alterazioni di VHL e HIF1alfa influenzano l'espressione e la localizzazione dei prodotti proteici da loro codificati. Le alterazioni bialleliche di VHL con perdita di espressione di pVHL sono associate ad una localizzazione nucleare di HIF1alfa ed ad una prognosi infausta nei ccRCC intracapsulari.

MESSAGGIO CONCLUSIVO:

Le alterazioni del pathway pVHL/HIF1alfa rappresentano un evento iniziale nella carcinogenesi del ccRCC e sono coinvolte nella progressione tumorale attraverso la localizzazione nucleare di HIF1alfa.