

Indicatori prognostici della patologia tumorale di tipo epiteliale del grosso intestino



Ann. Ital. Chir., LXXIII, 6, 2002

A. Forte¹, A. D'Urso¹, L.S. Gallinaro¹,
G. Lo Storto¹, A. Covotta¹, G. Soda²,
D. Bosco², S. Nardoni², M. Bezzi¹,
V. Beltrami¹

¹Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Tecnologie Mediche
Applicate Div. IV Clinica Chirurgica,
Università "La Sapienza", Roma

²Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia,
Università "La Sapienza", Roma

Introduzione

Attualmente l'exeresi chirurgica rappresenta l'approccio terapeutico fondamentale nel cancro del colon-retto. Tradizionalmente il criterio prognostico più rilevante è lo stadio della malattia al momento della diagnosi in base al sistema di stadiazione proposto da Dukes nel 1944 con le successive modifiche ed integrazioni^(10,11).

Sono state correlate alla prognosi numerose variabili istopatologiche: l'istotipo⁽⁴⁷⁾, il grado di differenziazione^{11,17,18}, il pattern di crescita⁽²⁸⁾, l'infiltrazione linfocitaria peritumorale⁽²⁶⁾ e la presenza di invasione venosa^(4, 17, 34). Nonostante i numerosi progressi nella diagnosi e nel trattamento del cancro del colon-retto, circa il 40% dei pazienti muore ogni anno per malattia disseminata⁽³⁶⁾. Pertanto si rende necessaria la continua ricerca di nuovi fattori in grado di fornire una maggiore attendibilità prognostica. La determinazione del contenuto di DNA e della percentuale di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare mediante la citofluorometria a flusso, sono state oggetto di attento studio per individuare un'eventuale implicazione predittiva nei pazienti portatori di carcinoma del colon^(8, 14, 25, 30, 31, 37, 38, 40, 41, 43).

L'aneuploidia non è che l'espressione delle anomalie cromosomiche frequenti nelle cellule tumorali maligne. Tuttavia allo stato attuale delle conoscenze il significato

Abstract

PROGNOSTIC MARKERS IN THE LARGE BOWEL EPITHELIAL TUMORS

The surgical treatment of large bowel malignant tumors is now the most important therapeutic approach. The aim of our study was to evaluate a possible prognostic implication of ploidy and NM23 expression. The study includes 120 non selected patients who underwent surgery for colorectal cancer. The analysis of ploidy was obtained with cytometric test. The cases with only one gaff Go/G1 were considered as diploid. Patteras with more than one aneuploidic population were classified as multiploidic or poliploidic. While NM23 expression was evaluated with a double blind retrospective study by two separate equipe of autors in different centres. NM23 positivity degree was classified in 3 classes: absent or weak if <10%; moderate if 10-50%; strong if >50%. Forty-two patients (35%) were classified as diploidic; 30 patients (25%) as aneuploidic; 40 patients (33.2%) as multiploidic; in 8 cases (6.7%) the material was inadequate. Among the two groups who evaluated NM23 expression the group I a positivity: absent or weak in 32 cases (26.7%); moderate in 62 cases (51.7%); strong in 26 cases (21.6%); while the group II shows positivity: absent or weak in 30 cases (25%); moderate in 52 cases (43.3%); strong in 38 cases (31.7%). We cannot consider ploidy and the NM23 research as independent prognostic factor.

Key words: Colorectal cancer, ploidy, NM23.

prognostico della ploidia nel carcinoma del colon-retto è piuttosto discordante^(1, 3, 6, 9, 12, 14, 30, 37, 39, 41, 46).

Controverso è il ruolo del gene NM23 quale fattore prognostico^(5, 15, 32, 33, 44, 45); esso localizzato sul cromosoma 17, codifica una proteina (nucleoside difosfato-kinasi A:NDPHA) che sembrerebbe interferire con la progressione del carcinoma coloretale e con la metastatizzazione^{7,21,48}. Alcuni studi indicano che la delezione allelica del braccio corto del cromosoma 17 è una delle più frequenti alterazioni genetiche del carcinoma del colon-retto.

La finalità dello studio da noi eseguito è quella di confrontare i parametri prognostici menzionati con l'anda-

mento clinico dei pazienti, al fine di individuare indicatori di reale importanza prognostica nella patologia tumorale di tipo epiteliale del grosso intestino.

Materiali e metodi

Lo studio comprende 120 pazienti consecutivi, non selezionati, sottoposti ad intervento chirurgico per carcinoma coloretale, giunti alla nostra osservazione nel periodo compreso tra Gennaio 1994 e Dicembre 1997.

Durante la degenza pre-operatoria tutti i pazienti sono stati sottoposti a Rx torace, ecografia addome, talora integrata ad ecografia epatica intraoperatoria, e TC addome-pelvi, al fine della stadiazione clinica della patologia.

Nella stadiazione TNM si è tenuto conto dell'analisi istopatologica relativa alla grandezza della massa tumorale, dell'infiltrazione della parete e l'eventuale sconfinamento negli organi circostanti, lo stato linfonodale, l'eventuale presenza di metastasi a distanza, il tutto integrato con le notizie cliniche ed i risultati degli accertamenti diagnostici.

Nel presente lavoro gli stadi I e II sono considerati in un unico gruppo a scopo esemplificativo.

L'analisi istopatologica è stata condotta sulla valutazione di un numero cospicuo di inclusioni per ciascun caso, su sezioni colorate con ematossilina, eosina e PAS, valutando i seguenti parametri:

Istotipo: adenocarcinomi e carcinomi mucoidi.

Grado di differenziazione: ben differenziati, moderatamente differenziati e scarsamente differenziati.

Pattern di crescita: tipo espansivo e tipo infiltrativo.

Infiltrazione linfocitaria peritumorale: assente o scarsa, moderata, marcata.

Invasione venosa ed infiltrazione peritumorale: presente, assente.

L'analisi citofluorometrica si è avvalsa dell'utilizzo di un citometro statico di un sistema software applicato all'analisi d'immagine che valuta il contenuto del DNA e la struttura cromatica. Il materiale valutato è stato ottenuto per apposizione diretta su un semplice vetrino portaoggetti delle sezioni delle varie neoplasie asportate e successivamente fissate mediante formalina e colorate con metodica Fuelgen.

Nella interpretazione degli istogrammi sono stati considerati diploidi i casi con singolo picco Go/G1, sovrapponibile allo stesso picco della mucosa colica normale. I campioni con più di una popolazione aneuploide sono stati classificati come multiploidi o poliploidi.

Infine mediante uno studio retrospettivo a doppio cieco, condotto da due equipe distinte di autori in sedi diverse ed in assenza di notizie cliniche e anatomopato-

logiche è stata valutata l'espressione del NM23 NDPH protein-chinasi che verranno distinti in gruppo I e gruppo II.

Le sezioni a più alta rappresentatività del tumore sono state digerite e poi incubate a 4° C con l'anticorpo primario alla diluizione pari a 1:50. Un kit del complesso avidina-streptavidina, è stato usato secondo le istruzioni della ditta produttrice. L'attività perossidasi è stata evidenziata con 3-amino-9-etilcarbazolo (AEC) e le sezioni sono state controcolorate con ematossilina di Meyer. Per il controllo negativo le sezioni sono state incubate con siero non immune invece dell'anticorpo primario. Il grado di intensità della colorazione è stato valutato contando almeno 200 cellule tumorali per ogni sezione ingrandita a H.P.F.

L'espressione dell'nm23 è risultata prevalentemente citoplasmatica ed è stata quantificata valutando la percentuale delle cellule tumorali e la reattività inequivocabile di colorazione citoplasmatica delle stesse.

Il grado di positività per l'NM23 è stato classificato pertanto in 3 categorie:

- positività assente o debole in assenza di cellule positive ovvero positività cellulare <10%;
- positività moderata con positività cellulare 10-50%;
- positività forte con positività cellulare >50%.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad intervento chirurgico radicale con exeresi del tumore e linfadenectomia fino all'origine dei rami vascolari; sono stati poi seguiti nel periodo post-operatorio con controlli periodici fino al giugno 2000.

La relazione tra l'espressione dell'NM23-1 e la ploidia con le variabili istopatologiche è stata analizzata con il test del χ^2 . La curva di sopravvivenza è stata calcolata utilizzando il metodo di Kaplan-Mayer ed analizzata con il long-rank test.

Risultati

I 120 casi di neoplasia maligna del grosso intestino riportati nel campione sono costituiti da 106 (88%) adenocarcinomi e 14 (12%) carcinomi mucoidi.

Nella distribuzione per stadio abbiamo 62 (51.7%) tumori in stadio I e II, 48 (40%) tumori in stadio III e 10 (8.3%) in stadio IV.

Inoltre 70 (58.3%) pazienti non presentavano alcuna propagazione metastatica linfonodale all'intervento chirurgico, 32 (26.7%) con presenza da 1 a 3 linfonodi metastatici e 18 (15%) pazienti con più di tre metastasi linfonodali. Un pattern di crescita infiltrativo è stato da noi identificato in 52 (43.3%) casi, rispetto ai 68 (56.7%) casi di tipo espansivo (Tab. I).

Tutti i casi in esame sono stati sottoposti a controllo del contenuto di DNA.

Pertanto 42 (35%) di essi sono stati classificati come diploidi, 30 (25%) aneuploidi, 40 (33.3%) multiploidi; in 8 (6.7%) casi non è stata possibile alcuna classificazione a

Tab. I – CONFRONTO DEI PARAMETRI PROGNOSTICI CON ETÀ, SESSO, LOCALIZZAZIONE E SOPRAVVIVENZA DEI PAZIENTI

Ca. colon 120 pazienti		Sesso/età				Localizzazione*					Mesi dall'intervento				Decessi (mesi) al follow-up				TOT.								
		M	M	F	F	R.	S.	Cd.	Cs.	Ctr.	0				12					36							
											12				36					60				60			
											< 60	> 60	< 60	> 60	/	/	/	>		/	/	/	>	/	/	/	>
		60	60	60	60						12	36	60	60	12	36	60	60									
Ca.mucoso		0	6	4	4	4	2	0	2	6	0	0	0	2	2	4	6	0	14								
Istotipo																											
Adenocarcinoma		20	30	14	42	36	16	28	8	18	0	2	24	18	8	38	16	0	106								
Ben differenziato		4	4	0	4		2	6	2	2		0	2	6	0	0	4	0	12								
Moderatamente differenziato		16	28	12	40	36	12	20	8	20	0	2	22	12	8	40	12	0	96								
Scarsamente differenziato		0	4	6	2	4	4	2	0	2	0	0	0	2	2	2	6	0	12								
Stadio	I-II	10	18	12	22	20	8	16	8	10	0	0	18	20	4	6	14	0	62								
	II	10	14	4	20	18	6	10	2	12	0	2	6	0	2	32	6	0	48								
	IV	0	4	2	4	2	4	2	0	2	0	0	0	0	4	4	2	0	10								
Linfonodi metastatici	0	10	24	10	26	20	12	16	4	18	0	0	18	20	8	16	8	0	70								
	1-3	6	12	2	12	4	4	8	2	4	0	2	6	0	2	16	6	0	32								
	>4	4	0	6	8	6	2	4	4	2	0	0	0	0	0	10	8	0	18								
Ripetizioni in altri organi	Si	0	12	2	6	2	4	6	4	4	0	0	0	0	4	12	4	0	20								
	No	20	24	16	40	30	14	22	6	20	0	2	24	20	6	0	18	0	100								
	Si	8	2	0	2	6	0	4	0	2	0	0	0	0	2	8	2	0	12								
Recidive locali																											
Recidive distali	No	12	34	18	44	34	18	24	10	22	0	2	24	20	8	34	20	0	108								
	Si	10	10	8	12	14	8	14	0	4	0	0	0	1	6	18	15	0	40								
	No	10	26	10	34	26	10	14	10	20	0	2	24	19	4	24	7	0	80								
Pattern di crescita	Espansivo	12	16	12	28	22	12	14	6	14	0	2	20	14	2	18	12	0	68								
	Infiltrativo	8	20	6	18	18	6	14	4	10	0	0	4	6	8	24	10	0	52								
	Si	0	4	0	4	4	2	0	0	2	0	0	0	0	4	4	0	0	8								
Invasione venosa																											
Infiltrazione Linfocitaria	No	20	32	18	42	36	16	28	10	22	0	2	24	20	6	38	22	0	112								
	Scarsa	2	14	8	18	12	4	10	6	10	0	2	6	6	4	16	8	0	42								
	Moderata	8	22	8	20	22	12	10	4	10	0	0	14	8	4	22	10	0	58								
	Marcata	10	0	2	8	6	2	8	0	4	0	0	4	6	2	4	4	0	20								
TOT.		20	36	18	46	40	18	28	10	24	0	2	24	20	10	42	22	0									

*R.=Retto; S.= Sigma; Cd.= Colon destro; Cs.= Colon sinistro; Ctr.= Colon trasverso.

causa dell' insufficiente materiale apposto (Tab. II). Tra i 18 (15%) pazienti con più di 4 linfonodi metastatici abbiamo riscontrato 6 (33.3%) casi di diploidia, 6 (33.3%) di aneuploidia e 6 (33.3%) di multiploidia.

Tra i 70 (58.3%) pazienti con assenza di ripetizioni metastatiche linfonodali abbiamo avuto 26 (37.1%) forme di diploidi, 38 (54.3%) aneuploidi-multiploidi e 6 (8.6%) casi senza classificazione.

Tab. II – CONFRONTO DEI PARAMETRI PROGNOSTICI CON L'ANALISI CITOFLUOROMETRICA ED IL GRADO DI POSITIVITÀ PER L'NM23

Ca. colon 120 pazienti		Dipl.	Aneup.	Ploidia*		Mat.	Ins.	PositivitàNM23•			Positività NM23•			TOT.
				Multip.				Gruppo I			Gruppo II			
								Ass/liev.	Moder.	Forte	Ass/liev.	Moder.	Forte	
Stadio	I-II	20	14	22		6		20	28	14	20	22	20	62
	III	16	14	16		2		10	28	10	8	24	16	48
	IV	6	2	2		0		2	6	2	2	6	2	10
Ben differenziato		4	4	2		2		6	4	2	6	4	2	12
Moderatamente differenziato		32	22	34		6		22	52	22	20	42	34	96
Scarsamente differenziato		6	2	4		0		4	6	2	4	6	2	12
	0	26	12	26		6		0	34	16	22	30	18	70
Linfonodi Metastatici	1-3	10	12	8		2		10	18	4	6	17	9	32
	>4	6	6	6		0		2	10	6	2	5	11	18
	Si	4	4	12		0		2	10	8	4	8	8	20
Ripetizioni in altri organi														
	No	38	26	28		8		30	52	18	26	44	30	100
	Si	2	4	4		2		4	6	2	4	6	2	12
Recidive Locali														
	No	0	26	36		6		28	56	24	26	46	36	108
	Si	12	12	14		2		8	26	6	8	21	11	40
Recidive distali														
	No	30	18	26		6		24	36	20	22	31	27	80
	Espansivo	8	18	16		6		16	32	20	16	26	26	68
Pattern di crescita														
	Infiltrativo	14	12	24		2		16	30	6	14	24	14	52
	Si	6	0	2		0		4	4	0	4	4	0	8
Invasione venosa														
	No	36	30	3		8		28	58	26	26	48	38	112
	Scarsa	10	12	20		0		8	16	18	10	13	19	42
Infiltrazione Lifocitaria														
	Moderata	20	14	18		6		18	36	4	14	31	13	58
	Marcata	12	4	2		2		6	10	4	6	8	6	20
TOT.		42	30	40		8		32	62	26	30	52	38	

*Dipl.= Diploidi; Aneup.= Aneuploidi; Multip.= Multiploidi; Mat. Ins.= Materiale insufficiente

•Ass/liev.= Assente/lieve; Moder.= Moderata

Una maggiore tendenza alla aneuploidia e multiploidia è stata osservata nelle forme tumorali a crescita infiltrativa e nei tumori con infiltrazione linfocitaria peritumorale scarsa o moderata (Tab. II).

Dei due gruppi che hanno valutato l'espressione dell'NM23H il gruppo I ha ottenuto positività assente/debole in 32 (26.7%) casi, positività moderata in 62 (51.7%) casi e positività forte in 26 (21.6%) casi; men-

tre il gruppo II ha riportato una positività assente/debole in 30 (25%) casi, positività moderata in 52 (43.3%) casi e positività forte in 38 (31.7%) casi. In rapporto alla presenza di metastasi linfonodali per i 70 (58.3%) casi con assenza di ripetizioni linfonodali abbiamo per il gruppo I, 20 (28.6%) casi con positività assente/debole, 34 (48.6%) casi con positività moderata, 16 (22.8%) casi con positività forte, mentre per il gruppo II i dati sono rispettivamente di 22 (31.4%), 30 (42.9%) e 18 (25.7%) casi.

Per i 32 (26.6%) casi con assenza da 1 a 3 linfonodi metastatici abbiamo avuto per il gruppo I, 10 (31.25%) risposte a positività assente/debole, 18 (56.25%) a positività moderata, 4 (12.5%) a positività forte mentre i dati riscontrati nel gruppo II sono stati rispettivamente di 6 (18.7%), 17 (53.1%) e 9 (28.2%) casi.

Per i 18 (15%) casi con più di tre linfonodi metastatici abbiamo avuto per il gruppo I, 2 (11.1%) risposte a positività assente/debole, 10 (55.6%) a positività moderata e 6 (33.3%) a positività forte; mentre per il gruppo II i rispettivi dati sono stati 2 (11.1%), 5 (27.8%) e 11 (61.1%).

Nei 20 (16.6%) casi che presentavano ripetizioni in altri organi abbiamo riscontrato una positività assente/debole in 2 (10%) casi per il gruppo I e in 4 (20%) casi per il gruppo II, mentre positività moderata e forte rispettivamente in 18 (90%) e 16 (80%) casi.

Infine tra i 40 (33.3%) pazienti che nel corso dello studio hanno riportato recidive distali, entrambi i gruppi hanno riportato 8 (20%) casi con positività assente/debole all' NM23 e 32 (80%) a positività moderata o forte; nei restanti 80 (66.7%) pazienti esenti da recidive distali abbiamo avuto per i gruppi I e II rispettivamente 24 (30%) e 22 (27.5%) casi a positività assente/debole e 56 (70%) e 58 (72.5%) con positività moderata o forte (Tab. II).

Alla verifica attuale dei 120 pazienti sottoposti a follow up ci risultano 74 (61.7%) decessi e 46 (38.3%) viventi, e di questi ultimi 2 (4.3%) non hanno ancora supe-

rato i 3 anni del post-operatorio, 24 (52.2%) si trovano tra i 3 e i 5 anni e 20 (43.5%) hanno superato i 5 anni di vita del post-operatorio.

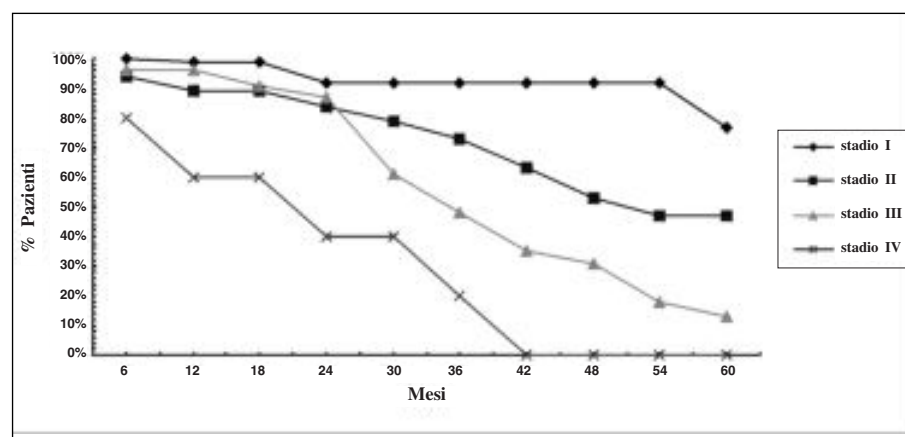
Dei 46 (38.3%) pazienti attualmente viventi, 38 (82.6%) erano stati classificati in stadio I-II e di essi 20 (52.6%) hanno superato i 5 anni del post-operatorio; 8 (17.4%) erano stati classificati in stadio III e di essi 2 (25%) non hanno superato i 3 anni del post-operatorio e 6 (75%) si trovano tra 3 e 5 anni.

Tutti e 10 (8.3%) i pazienti in stadio IV sono deceduti. La curva di sopravvivenza di Kaplan-Mayer per lo stadio ha evidenziato una sopravvivenza a 2 anni del 92%, dell'84%, dell'87% e del 40% rispettivamente per lo stadio I, II III e IV e a 5 anni del 77% per lo stadio I, del 47% per lo stadio II, del 13% per lo stadio III, mentre i pazienti in stadio IV erano tutti deceduti a 42 mesi. L'analisi della distribuzione dei dati così ottenuti con il test del χ^2 , ha mostrato un valore di $p < 0.01$ (Tab. III). Sempre dei 46 (38.3%) pazienti attualmente viventi 38 (82.6%) non presentavano all'intervento alcuna presenza di metastasi linfonodali e di questi 20 (52.6%) hanno superato i 5 anni di vita post-operatoria; 8 (17.4%) presentavano da 1 a 3 linfonodi metastatici all'intervento chirurgico. Sono deceduti tutti i pazienti con più di 3 linfonodi metastatici e tutti i pazienti con presenza di ripetizioni in altri organi al momento dell'intervento o che hanno riportato recidive locali nel post-operatorio, così come tutti i pazienti che presentavano invasione venosa.

Dei 40 (33.3%) pazienti che hanno riportato ripetizioni metastatiche a distanza nel post-operatorio solo 1 (2.5%) è vivente, ha superato i cinque anni di sopravvivenza; presentava 1 metastasi linfonodale all'intervento e a dieci mesi 1 ripetizione epatica per cui è stato sottoposto a resezione epatica.

Tra i 14 (11.6%) pazienti con carcinoma mucoso 2 (14.3%) sono in vita ed hanno superato i cinque anni, gli altri sono deceduti; inoltre dei 12 (11%) con tumore a cellule ben differenziate 8 (66.6%) sono viventi e

Tab. III – SOPRAVVIVENZA ATTUARIALE PER LO STADIO CLINICO



Tab. IV – CONFRONTO DELLA SOPRAVVIVENZA CON L' ANALISI CITOFLUOROMETRICA ED IL GRADO DI POSITIVITÀ PER L'NM23

<i>Ca. colon</i>		<i>Ploidia*</i>				<i>PositivitàNM23•</i>			<i>Positività NM23•</i>			<i>TOT.</i>
<i>120 pazienti</i>		<i>Dipl.</i>	<i>Aneup.</i>	<i>Multip.</i>	<i>Mat. Ins.</i>	<i>Gruppo I</i>			<i>Gruppo II</i>			
						<i>Ass/liev.</i>	<i>Moder.</i>	<i>Forte</i>	<i>Ass/liev.</i>	<i>Moder.</i>	<i>Forte</i>	
Mesi	0-12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
da	12-36	2	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2
int.	36-60	10	8	4	2	10	10	4	6	10	8	24
	>60	8	4	6	2	6	10	4	4	10	6	20
Decessi	0-12	6	2	2	0	2	8	0	2	6	2	10
mesi	12-36	8	12	2	2	8	24	10	10	17	15	42
follow-up	36-60	8	4	8	2	6	8	8	8	7	7	22
	>60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOT.		42	30	40	8	32	62	26	30	52	38	120

*Dipl.= Diploidi; Aneup.= Aneuploidi; Multip.= Multiploidi; Mat. Ins.= Materiale insufficiente

•Ass/liev.= Assente/

di essi ben 6 (75%) hanno superato i cinque anni di vita. Dei 68 (56.6%) con pattern di crescita infiltrativo 36 (53%) sono viventi e 32 (47%) sono deceduti mentre dei 52 (43.3%) con pattern di crescita infiltrativo 10 (19.2%) sono viventi e 42 (80.8%) sono deceduti.

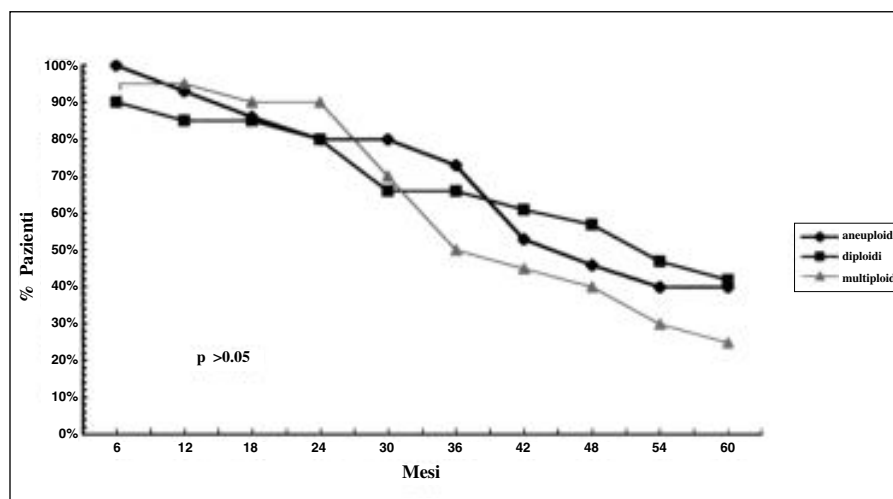
Nel confronto con il grado di infiltrazione linfocitaria peritumorale abbiamo che dei 42 (35%) casi con scarsa infiltrazione linfocitaria 14 (33.3%) sono viventi e 28 (66.7%) deceduti; dei 58 (48.3%) casi con moderata infiltrazione linfocitaria 22 (38%) sono viventi e 36 (62%) deceduti infine dei 20 (16.7%) casi con marcata infiltrazione linfocitaria 10 (50%) sono viventi e 10 (50%) deceduti (Tab. I).

Lo studio della ploidia ha mostrato che dei 42 (35%) casi diploidi 20 (47.6%) sono viventi e 22 (52.4%) de-

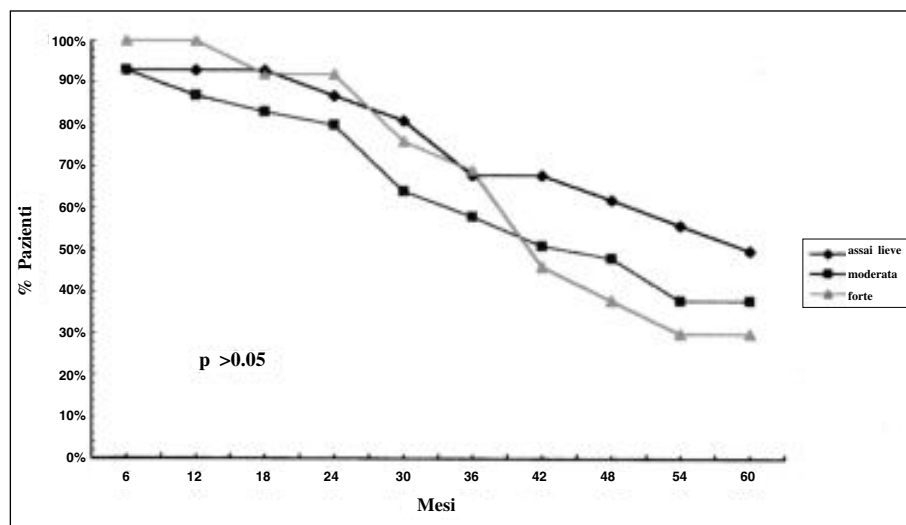
ceduti, dei 30 (25%) aneuploidi 12 (40%) sono viventi e 18 (60%) deceduti, infine dei 40 (33.3%) multiploidi abbiamo 10 (25%) in vita di cui 6 (60%) che hanno superato i 5 anni e 30 (75%) deceduti (Tab. IV). La curva di Kaplan-Mayer ha evidenziato una sopravvivenza pressoché sovrapponibile per gli aneuploidi ed i diploidi, rispettivamente dell'80% per entrambi a 2 anni e del 40% e 42% a 5 anni; per i multiploidi invece una sopravvivenza a 2 anni del 90% e a 5 anni del 25%. I dati così ottenuti ed analizzati con il test del χ^2 hanno mostrato un $p > 0.05$ (Tab. V).

Nella ricerca del grado di positività all'NM23 il gruppo I ha constatato che dei 32 (26.6%) casi a positività assente/lieve 16 (50%) sono viventi e 16 (50%) deceduti, dei 62 (51.7%) casi a positività moderata 22 (35.5%) sono

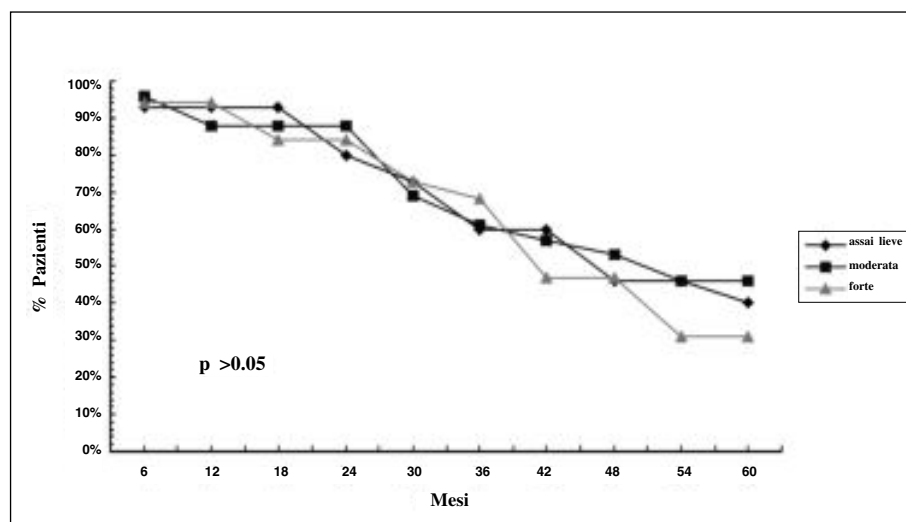
Tab. V – SOPRAVVIVENZA ATTUARIALE PER LA PLOIDIA



Tab. VI – SOPRAVVIVENZA ATTUARIALE PER L'NM23 (GRUPPO I)



Tab. VI – SOPRAVVIVENZA ATTUARIALE PER L'NM23 (GRUPPO II)



viventi e 40 (64.5%) deceduti mentre per i 26 (21,7%) casi a positività forte 8 (30.8%) sono viventi e 18 (69.2%) deceduti; i dati riportati invece dal gruppo II sono stati che per i 30 (25%) casi a positività assente/lieve 10 (33.3%) sono viventi e 20 (66.7%) deceduti, dei 52 (43.3%) casi a positività moderata 22 (42.3%) sono viventi e 30 (57.7%) deceduti, infine per i 38 (31.7%) casi a positività forte 14 (36.8%) sono viventi e 24 (63.2%) deceduti (Tab. IV). La curva di Kaplan-Mayer ha evidenziato per il gruppo I una sopravvivenza quasi sovrapponibile con percentuali per la positività assente/lieve, moderata e forte rispettivamente del 87%, 80% e 92% a 2 anni e del 50%, 38% e 30% a 5 anni. I dati analizzati con il test del χ^2 hanno evidenziato un $p > 0.05$ (Tab. VI). Anche nel gruppo II le curve sono

pressoché sovrapponibili con sopravvivenze per la positività assente/lieve, moderata e forte del 80%, 88% e 84% a 2 anni e del 40%, 46%, e 31% a 5 anni. Il test del χ^2 ha fornito un $p > 0.05$ (Tab. VII).

Discussione e conclusione

Lo stadio della neoplasia al momento della diagnosi rappresenta il principale parametro prognostico del carcinoma del colon-retto, in particolare il significato prognostico del numero di metastasi linfonodali è accettato da tutti gli autori; un elevato numero di linfonodi metastatici è inversamente proporzionale alla possibilità di sopravvivenza^(11, 22, 28).

Nella nostra casistica tutti i pazienti in stadio IV sono deceduti entro i 5 anni dall'intervento chirurgico e dei 48 (40%) casi in stadio III solo 8 (16.6%) sono attualmente in vita. I dati ottenuti e analizzati con il test del χ^2 confermano l'attendibilità ($p < 0.01$) del significato prognostico dello stadio della neoplasia.

Anche secondo la nostra casistica, la presenza di metastasi linfonodali è stato un indice prognostico negativo per la sopravvivenza, infatti tutti i casi con più di 3 linfonodi metastatici presenti all'intervento sono deceduti e dei 32 (26.6%) casi con meno di 4 linfonodi metastatici solo 8 (25%) sono attualmente in vita ($p < 0.01$). Più controverso è il significato prognostico dell'analisi istopatologica.

I carcinomi mucoidi costituiscono il 10-15% (12% nella nostra casistica) dei tumori maligni del grosso intestino^(19, 47). Un andamento clinico più aggressivo da parte di questo istotipo rispetto all'adenocarcinoma è controverso. Nella nostra casistica, sebbene limitata a 14 (11.6%) casi, il carcinoma mucoide non sembra evidenziare maggiore aggressività rispetto all'adenocarcinoma, sicuramente viene evidenziato ad uno stadio maggiore. Sebbene molti autori ritengono che la determinazione del grado di differenziazione delle cellule neoplastiche sia piuttosto soggettiva, recenti studi hanno confermato che esso costituisca una variabile prognostica indipendente.^{4, 18}

I carcinomi del colon-retto caratterizzati da un pattern di crescita di tipo infiltrativo, come documentato, presentano una prognosi nettamente sfavorevole. Abbiamo riscontrato una mortalità dell'80% per i tumori a crescita infiltrativa e meno della metà per quelli a crescita espansiva. I tumori a crescita infiltrativa risultando più aggressivi e scarsamente differenziati sono diagnosticati spesso in stadio avanzato.

L'infiltrazione linfocitaria peritumorale non sembra rappresentare una variabile prognostica indipendente^(6, 7, 26, 28). Tuttavia può essere utile ad identificare sottogruppi di neoplasie con prognosi più o meno favorevole; nella nostra casistica non è stata riscontrata in alcun tumore in stadio IV. La presenza di un cospicuo infiltrato linfocitario peritumorale è stata da noi riscontrata spesso nei tumori in stadio precoce, mentre un'infiltrazione linfocitaria scarsa è stata individuata soprattutto nei pazienti deceduti.

Alcuni autori hanno evidenziato che la invasione neoplastica delle vene intramurali non ha significato prognostico⁽³⁴⁾. Nella nostra esperienza tale parametro assume un significato prognostico negativo, tutti i pazienti con invasione venosa neoplastica sono deceduti.

In letteratura la valutazione della ploidia a scopo prognostico, nel carcinoma coloretale, sia in relazione allo stadio sia alle altre variabili clinico-patologiche, non è di facile interpretazione^(2, 6, 7, 9, 12, 13, 15, 20, 27, 49).

I risultati ottenuti nei diversi studi sono talora notevolmente discordanti. A tale riguardo concorre probabilmente la mancata standardizzazione della metodica.

Da un'analisi complessiva dei dati riportati in letteratura

sembra evidenziarsi un incremento delle forme aneuploidi nei tumori in fase avanzata. Tuttavia solo di rado lo stadio è risultato correlarsi in modo significativo alla ploidia^(9, 40).

Nella analisi condotta da Jass su 369 casi di cancro del colon-retto è emersa una relazione significativa tra ploidia e pattern di crescita e tra ploidia e infiltrazione linfocitaria peritumorale⁽²⁹⁾.

Scott evidenziava una correlazione tra presenza di cloni cellulari aneuploidi ed invasione venosa⁽⁴⁰⁾.

Da parte nostra abbiamo potuto notare innanzitutto una non completa affidabilità della metodica adottata; infatti su 120 casi esaminati, in 8 (6.6%) non è stata possibile alcuna catalogazione per materiale in esame insufficiente.

Inoltre anche con l'uso di tessuto fresco da parte di altri autori, la ploidia si modifica in base al punto di prelievo del tessuto nel contesto del tumore⁽⁹⁾.

Nella nostra casistica abbiamo riscontrato una relazione non sempre indicativa tra stadio della neoplasia e ploidia e nessuna correlazione tra questa e gli altri parametri istopatologici. Infatti dei 18 (15%) pazienti con più di 3 linfonodi sede di metastasi all'intervento chirurgico, 6 (33.3%) sono risultati affetti da neoplasie con corredo genetico diploide, 6 (33.3%) aneuploide e 6 (33.3%) multiploide.

Alcuni autori^(3, 4) evidenziano una prognosi significativamente migliore per i pazienti con tumori diploidi rispetto a quelli con forme tumorali aneuploidi, anche se per la maggior parte di essi non è riconosciuta come variabile prognostica indipendente^(1, 29).

Nella nostra esperienza la ploidia risulta essere un parametro prognostico non attendibile ($p > 0.05$) e contrastante; andando infatti ad analizzare le sopravvivenze secondo Kaplan-Mayer le curve sono pressoché sovrapponibili e non vi è praticamente differenza tra i pazienti aneuploidi e diploidi 40% rispetto al 42% di sopravvivenza a 5 anni. Pertanto la ploidia non può essere considerata una variabile prognostica indipendente.

Inoltre la tecnica citofluorometrica presenta un elevato numero di variabili: modalità di campionamento, preparazione e colorazione della sospensione macrocellulare, calibrazione degli strumenti ed interpretazione degli istogrammi. La mancanza di standardizzazione delle procedure rende spesso poco affidabili e riproducibili le misure effettuate spiegando in parte i risultati contrastanti emersi dai vari studi effettuati sul valore prognostico della ploidia^(9, 46).

La positività all'NM23 è collegata all'invasività, sia locale che a distanza, della neoplasia, poiché la colorazione immunoistochimica citoplasmatica è il risultato dell'alterata produzione quantitativa e qualitativa della proteina agente soppressore delle metastasi^(9, 16, 23, 24, 35, 42, 48).

Cohn e coll⁽⁷⁾ hanno dimostrato che il 73% dei pazienti con tumore del colon-retto senza evidenza di metastasi al momento dell'intervento chirurgico ma con delezione di NM23, sviluppa metastasi in un follow up

medio di 25 mesi in confronto al solo 20% dei pazienti senza delezione di NM23.

Alcuni gruppi di ricerca hanno dimostrato che livelli di NM23 più elevati sono significativamente correlati ad una prognosi migliore⁽³⁵⁾ per cui alcuni hanno ipotizzato l'NM23 essere un fattore prognostico addizionale ed indipendente per la stadiazione della malattia.

Questi dati contrastano con quanto evidenziato da Haut e coll.²¹ che non hanno notato alcuna associazione tra la mutazione di NM23 e lo sviluppo di metastasi. Nella nostra casistica lo studio condotto in doppio cieco non ha mostrato alcuna evidente correlazione tra la positività all'NM23 e l'invasività e metastatizzazione della neoplasia. Anche per questi due gruppi la sopravvivenza a 5 anni secondo la curva di Kaplan-Mayer non ha fornito informazioni dirimenti sulla validità della positività essendo le curve sovrapponibili e senza significativa differenza di sopravvivenza ($p > 0.05$).

In conclusione, in base ai dati della nostra esperienza e a quanto riportato in letteratura, possiamo dire che lo stadio di diffusione della malattia e la valutazione delle variabili istopatologiche consentono una buona definizione prognostica delle neoplasie coloretali. Lo studio del contenuto di DNA sembra indicare che la ploidia rifletta essenzialmente una proprietà biologica della cellula non associata ad una maggiore invasività e capacità metastatica; a questo si associa la mancanza di standardizzazione della metodica. La valutazione immunohistochimica dell'NM23, sebbene caratterizzata dalla facile riproducibilità della metodica e dalla non invasività della stessa, non ha evidenziato una netta correlazione tra la positività dell'esame e la metastatizzazione della neoplasia.

In definitiva non possiamo considerare e la ploidia e la ricerca dell'NM23 variabili prognostiche indipendenti.

Riassunto

L'exeresi chirurgica è attualmente l'approccio terapeutico fondamentale nelle neoplasie maligne del grosso intestino. La finalità del nostro studio è stata quella di valutare un'eventuale implicazione prognostica della ploidia e dell'espressione del NM23. Lo studio comprende 120 pazienti non selezionati sottoposti ad intervento chirurgico per carcinoma coloretale. L'analisi della ploidia è stata ottenuta con la citometria a flusso. Sono stati considerati diploidi i casi con singolo picco Go/G1. Campioni con più di una popolazione aneuploide sono stati classificati multiploidi o pliploidi. Mentre l'espressione dell'NM23 è stata valutata mediante uno studio retrospettivo a doppio cieco da due equipe distinte di autori in sedi diverse n grado di positività per l'NM23 è stato classificato in 3 categorie, con positività: assente o debole se $< 10\%$; moderata se $10-50\%$; forte se $> 50\%$. Quarantadue pazienti (35%) sono stati classificati come diploidi; 30 (25%) aneuploidi; 40 (33.2%) multiploidi;

in 8 casi (6.7%) il materiale era insufficiente. Dei due gruppi che hanno valutato l'espressione dell'NM23 il gruppo I ha ottenuto positività: assente/debole in 32 casi (26.7%); moderata in 62 casi (51.7%); forte in 26 casi (21.6%); mentre il gruppo II: assente/debole in 30 casi (25%); moderata in 52 casi (43.3%); forte in 38 casi (31.7%). Non possiamo considerare la ploidia e la ricerca dell'NM23 variabili prognostiche indipendenti.

Parole chiave: Carcinoma coloretale, ploidia, NM23.

Bibliografia

- 1) Boettger T.C., Gabbert H.E., Stole M. et al.: *DNA image cytometry: a prognostic tool in rectal cancer?* Dis Colon Rectum, 5:436-443, 1992.
- 2) Carlon C.A., Fabris G., Arlsan-Pagnini C., Pluchinotta A.M., Chinelli E., Carniato S.: *Prognostic correlations of operable carcinoma of the rectum.* Dis Colon Rectum, 28:47-50, 1985.
- 3) Chang K.J., Enker W.E., Melamed M.: *Influence of tumor cell DNA ploidy on the natural history of rectal cancer.* Am J Surg, 153:184-188, 1987.
- 4) Chapuis P.H., Dent O.F., Fisher R., Newland R.C., Phelis M.T., Smith E., Colquhoun K.: *A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer.* Br J Surg, 72:698-702, 1985.
- 5) Cheah P.Y., Cao X., et al.: *NM23-H1 immunostaining is inversely associated with tumor staging but not overall survival or disease recurrence in colorectal adenocarcinomas.* Br J Cancer, 77(7):1164-8, 1998.
- 6) Cohn K.H., Ornstein D.L., Wang F., La Paix F.D., et al.: *The significance of allelic deletions and aneuploidy in colorectal carcinoma.* Cancer, 15, 79(2):233-44, 1997.
- 7) Cohn K.H., Wang F., Solomon W.B., Steeg P.S. et al.: *Association of nm23 allelic deletions with distant metastasis in colorectal carcinoma.* Lancet, 722-724, 1991.
- 8) Crissman J.D., Zarbo R.J., Ma C.K., Visscher D.W.: *Histopathological parameters and DNA analysis in colorectal adenocarcinomas.* Pathology Annual, 24/2:103-147, 1989.
- 9) Deans G.T., Williamson K., Heatley M., Hamilton P., Arthurs K., Crookard A., et al.: *The role of flow cytometry in carcinoma of the colon and rectum.* Surgery, Gynecology and Obstetrics, 177:377-382, 1993.
- 10) Dukes C.E.: *The classification of cancer of the rectum.* J Path Bacteriol, 35:323-332, 1932.
- 11) Dukes C.E., Bussey H.J.R.: *The spread of rectal cancer and its effect on prognosis.* Br J Cancer, 12:309-320, 1958.
- 12) Enker W.E., Kimmel M., Cibas E.S., Cranor M.L., Melamed M.R.: *DNA/RNA content and proliferative fractions of colorectal carcinomas: a five-years prospective study relating flow cytometry to survival.* J Natl Cancer Inst, 83:701-707, 1991.
- 13) Fisher E.R., Siderits R.H., Sass R., Fisher B.: *Value of assessment of ploidy in rectal cancers.* Arch Pathol Lab Med, 113:525-528, 1989.
- 14) Flyger H.L., Larsen J.K., Nielsen H.J., Christensen I.J.: *DNA ploidy in colorectal cancer, heterogeneity within and between tumors*

and relations to survival. *Citometry*, 15, 38(6):293-300, 1999.

- 15) Giarnieri E., Alderisio M., Valli C., Vecchione A., Forte A., Turano R., Pulcini M.: *Overexpression of NDP kinase nm23 associated with ploidy image analysis in colorectal cancer*. *Anticancer Res*, 15:2049-54, 1995.
- 16) Gunther K., Dworak O., Renke S., Pfluger R., et al.: *Prediction of distant metastases after curative surgery for rectal cancer*. *J Surg Res*, 103(1):68-78, 2002.
- 17) Halvorsen T.B., Seim E.: *Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer*. *J Clin Pathol*, 42:162-166, 1989.
- 18) Halvorsen T.B., Seim E.: *Degree of differentiation in colorectal adenocarcinomas: a multivariate analysis*. *J Clin Pathol*, 41:532-537, 1988.
- 19) Halvorsen T.B., Seim E.: *Influence of mucinous components on survival in colorectal adenocarcinomas: a multivariate analysis*. 41:1068-1072, 1988.
- 20) Harlow S.P., Eriksen B.L., Poggensee L., Chmiel J.S., Scarpelli D.G., Murad T., Bauer K.D.: *Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy in Astler-Coller Dukes stage C colonic adenocarcinomas*. *Cancer Res*, 51:2403-2409, 1991.
- 21) Haut M., Steeg P., Matkowitz S.: *Induction of nm23 expression in colon tumors of high and low metastatic potential*. *J Natl Cancer Inst*, 83:7121-7126, 1991.
- 22) Hermanek P.: *Colorectal carcinoma: histopathological diagnosis and staging*. *Clinical Gastroenterology*, 3:511-529, 1989.
- 23) Hermanek P.: *Onkologische und histopathologische Grundlage einer lokalen therapie in kurativer intention*. In: Hermanek P., Marzoli G.P., eds. *Lokale therapie des rektumkarzinoms*. Berlin, Springer, 7-14, 1994.
- 24) Hermanek P., Wittekind C.: *Residual tumor classification and prognosis*. *Semin Surg Oncol*, 10:12-20, 1994.
- 25) Hithoshi T., Koichi M., Tsumeki K., et al.: *Prognostic value of DNA ploidy patterns of colorectal adenocarcinoma: Univariate and multivariate analysis*. *Digestive Surgery*, 15/6:687-692, 1998.
- 26) Jass J.R.: *Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer*. *J Clin Pathol*, 39:585-589, 1987.
- 27) Jass J.R.: *Prognostic factors in colorectal cancer*. *Current Topics in Pathology*, 81:295-322, 1990.
- 28) Jass J.R., Atkin W.S., Cuzick J., et al.: *The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases*. *Histopathology*, 10:437-459, 1986.
- 29) Jass J.R., Sobin L.H.: *Histological typing of intestinal tumors*. WHO International Histological Classification of Tumors, 2nd edn, Springer-Verlag, Berlin, 1989.
- 30) Karelia N.H., Patel D.D., Desori N.S., Mehta H.V., et al.: *Prognostic significance of DNA aneuploidy and p21 ras oncoprotein expression in colorectal cancer and their role in the determination of treatment modalities*. *Int J Biol Markers*, 16(2):97-104, 2001.
- 31) Kouri M., Laasonen A., Mecklin J-P., et al.: *Diploid predominance in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma evaluated by flow cytometry*. *Cancer*, 65:1825-1829, 1990.
- 32) Lee J.C., Lin Y.J., Chow N.H., Wang S.T.: *Reappraisal of nm23-h1 in colorectal cancers*. *J Surg Oncol*, 76(1):58-62, 2001.
- 33) Lindmark G.: *NM23-H1 immunohistochemistry is not useful as predictor of metastatic potential of colorectal cancer*. *Br J Cancer*, 74(9):1413-8, 1996.
- 34) Minsky B.D., Mies C., Recht A., et al.: *Resectable adenocarcinoma of the rectosigmoid and rectum. II. The influence of blood vessel invasion*. *Cancer*, 61:1417-1424, 1988.
- 35) Mulcahy H.E., O'Donoghue D.P.: *Molecular biology: setting the stage in colorectal cancer?* *Gut*, 34:1476-1477, 1993.
- 36) Parker S.L., Tong T., Bolden S., Wingo P.A.: *Cancer statistics, 1996*. *CA Cancer J Clin*, 65:5-27, 1996.
- 37) Purdie C.A., Piris J.: *Histopathological grade, mucinous differentiation and DNA ploidy in relation to prognosis in colorectal carcinoma*. *Histopathology*, 36(2):121-6, 2000.
- 38) Rognum T.O., Lund E., Meling G.I., Langmark F.: *Near diploid large bowel carcinomas have a better five-years survival than aneuploid ones*. *Cancer*, 68:1077-1081, 1991.
- 39) Scintu F., Oggianu A., Frau G., Casula G.: *L'aneuploidia nelle cellule di carcinomi colorettali è un fattore prognostico utile nella pratica clinica? Risultati a sfavore*. *Chirurgia*, 8:113-117, 1995.
- 40) Scott N.A., Rainwater L.M., Wieand H.S., et al.: *The relative prognostic of flow cytometric DNA analysis and conventional clinicopathologic criteria in patients with operable rectal carcinoma*. *Dis Colon Rectum*, 30:513-520, 1987.
- 41) Silvestrini R.: *Relevance of DNA ploidy as a prognostic instrument for solid tumors*. *Ann Oncol*, 11(3):259-61, 2000.
- 42) Steeg P.S., Cohn K.H., Leone A.: *Tumor metastasis and nm23: current concepts*. *Cancer Cells*, 3:257-262, 1991.
- 43) Stipa S., Tirindelli Danesi D., Modini C.: *The importance of heterogeneity and of multiple site sampling in the prospective determination of deoxyribonucleic acid flow cytometry*. *Surg Gynecol Obstet*, 176:427-434, 1993.
- 44) Tabuchi Y., Nakamura T., Kuniyasu T., et al.: *Expression of nm23-h1 in colorectal cancer; no association with metastases, histological stage, or survival*. *Surg Today*, 29(2):116-20, 1999.
- 45) Tannapfel A., Kockerling F., Katalinic A., Wittekind C.: *Expression of nm23-H1 predicts lymph node involvement in colorectal carcinoma*. *Dis Colon Rectum*, 38:651-654, 1995.
- 46) Tridelli Danesi D., Spanò M., Altavista P.: *Quality control study of the Italian Group of Citometry on Flow cytometry cellular DNA content measurements*. *Cytometry*, 14:576-583, 1993.
- 47) Umpleby H.C., Ranson D.L., Williamson R.C.N.: *Peculiarities of mucinous colorectal carcinoma*. *Br J Surg*, 72:715-718, 1985.
- 48) Wang L., Patel U., Ghosh L., Chen H.C., Banerjee S.: *Mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer*. *Cancer Res*, 53:717-720, 1993.
- 49) Witzig T.E., Loprinzi C.L., Gonchoroff N.J., Reiman H.M., Cha S., et al.: *DNA ploidy and cell kinetic measurements as predictors of recurrence and survival in stages B2 and C colorectal adenocarcinoma*. *Cancer*, 68:879-888, 1991.

Commento

Commentary

Prof. Antonio RUSSO

Ordinario di Chirurgia Endoscopica
Università degli Studi di Catania

Il lavoro di Forte et al. tratta la valutazione dei sintomi significativi di un numero di parametri clinico-patologici nel cancro colo-rettale.

Lo stadio pTNM il tipo istologico di cancro il grado di differenziazione, l'infiltrazione linfocitaria peritumorale e la presenza di invasione vascolare neoplastica sono state retrospettivamente analizzate in un gruppo di 120 (consecutivi?) pazienti trattati chirurgicamente per cancro colo-rettale primario; ognuno di questi parametri sopra citati è stato (sperimentalmente) riferito alla prognosi. In aggiunta, in tutti i casi sia il contenuto di DNA delle cellule tumorali (DNA-ploide) che l'espressione della proteina immunoistochimica NM sono state analizzate.

Mentre una "buona correlazione" è stata trovata tra la prognosi del cancro ed alcune variabili morfologicamente testate, gli autori concludono che nessuna associazione è stata dimostrata tra i pazienti sopravvissuti e il DNA-ploide e l'espressione NM23.

Perfino lo studio patologico del materiale chirurgico appare accurato e ben documentato e riguarda la valutazione statistica dei risultati, inoltre gli Autori non forniscono un'analisi mono o pluri variata dei loro risultati.

Questo è un limite rilevante dello studio che riguarda ogni possibile confronto tra l'esperienza presentata ed i dati forniti dell'attuale letteratura.

This manuscript by A. Forte et al., deals with the evaluation of the prognostic of a number of clinico-pathological parameters in colorectal cancer. The pTNM stage, the cancer histotype, the grade of differentiation, the peri-tumoral lymphocyte infiltration and the presence of neoplastic vascular invasion have been retrospectively assessed in a series of 120 (consecutive?) patients surgically treated for primary colorectal cancer; each of the above-mentioned parameters was (tentatively) related to the prognosis. In addition in all case both the DNA content of the tumor cells (DNA-ploidy) and the immunohistochemical expression of NM23 protein were also evaluated.

While a "gold correlation" was detected between cancer prognosis and some of the tested morphological variables, Authors conclude that no association was demonstrated between patients survival and both DNA-ploidy and NM23 expression.

Even the pathological study of the surgical material appears accurate and well documented, this reviewer is concerned about the statistical evaluation of the results; authors do not provide either univariate or multivariate analysis of their results. This represents a relevant limit of the study that affects any possible comparison between the presented experience and the data provided by the current literature.

Autore corrispondente:

Dott. Angelo FORTE
Dipartimento di Scienze Chirurgiche e
Tecnologie Mediche Applicate
Div. IV Clinica Chirurgica
Università "La Sapienza"
Viale del Policlinico, 1
00161 ROMA
Tel. e fax: 06-4462397

