

Importanza clinica di un modello di carcinogenesi nel carcinoma del colon-retto



Ann. Ital. Chir., LXXII, 3, 2001

R. Spisni, P. Faviana*, R. Pingitore*,
M. Castagna*, R. Baroncini*, R. Biondi**,
B. Lagomarsini, C. Colizzi

Università degli Studi di Pisa, Dipartimento di Chirurgia

*Laboratorio di Anatomia e Istologia Patologica,

**Istituto di Anatomia e Istologia Patologica, Dipartimento di Oncologia.

Introduzione

Numerose osservazioni di carattere biologico, epidemiologico e clinico hanno evidenziato che il processo di carcinogenesi colon-rettale è caratterizzato da una sequenza di alterazioni genetiche che avvengono all'interno delle cellule tumorali. Il cancro del colon-retto (CCR) è una delle neoplasie meglio caratterizzate ed il suo modello sperimentale di tumorigenesi è stato diffusamente studiato.

Nel corso degli ultimi anni si è potuta evidenziare una correlazione temporale tra una serie di lesioni morfologiche precursori del CCR e le varie forme di danno al DNA cellulare (1, 2, 3, 4). Si ritiene che tali alterazioni siano responsabili dello sviluppo e della progressione neoplastica.

Secondo alcuni autori si possono individuare diversi stadi intermedi del CCR attraverso i quali, sotto l'effetto integrato di determinanti genetici ed ambientali, la mucosa normale si trasforma in tessuto neoplastica.

Questo modello ci fornisce una sequenza temporale del processo carcinogenetico del colon-retto (5, 6, 7).

L'evidenza istologica del cancro è preceduta da alterazioni genetiche in mucosa colica apparentemente normale. In tale modello di carcinogenesi si ritiene che ciascuna alterazione genetica specifica sia responsabile di una lesione morfologica e della maggiore aggressività della neoplasia. Uno dei principali problemi del cancro colon-rettale è infatti il diverso comportamento biologico dimo-

Abstract

CARCINOGENESIS OF COLON-RECTAL CANCER

Objective: Carcinoma of the rectal colon begins as a small neoplastic polyp which gradually increases in size and, after passing through various degrees of dysplasia, develops into an overtly malignant carcinoma. Clinical experience suggests that patients may be divided into subgroups based on the aggressivity of the tumour.

The genetic mutations associated with colorectal cancer have been studied and it is known that the genes primarily responsible for biological changes in the tumour cell, in the early stages, are APC, hMSH2, k-ras2 and, in particular, p53. Indeed, the mutation at the level of gene p53 has been recognized as the most common mutation in tumour cells. The aim of this study was investigate the role of p53 and CD34 in colorectal cancer.

Methods: We studied p53 positivity using immunohistological methods and compared our results with the site, stage (using the TNM system) and histological grade of the tumour. We evaluated CD34 positivity using the same methods in order to detect and quantify the presence of angiogenesis in colorectal cancer.

Result: P53 was found to be markedly raised in the T3 stage of colorectal cancer, while its expression was decreased in stage T2 and stage T1 carcinomas and it was not detectable in adenomas. These results suggest a close correlation between the tumour stage and the expression of p53. An analogous correlation was found between CD34 expression and angiogenesis.

Conclusion: The overexpression of p53 in epithelial cells and raised angiogenesis (as reflected in CD34 levels) in stromal cells could represent useful prognostic factors in the management of colorectal cancer.

Key words: Colorectal carcinoma, oncogene, p53, CD34.

strato dai singoli pazienti. Nonostante questi pazienti siano riuniti in gruppi corrispondenti per stadio oncologico secondo le più diffuse classificazioni, la progressione della malattia dal tempo della diagnosi, può variare notevolmente. Si possono avere forme di CCR di tipo indolente e forme di crescita aggressiva, alcune delle quali si

presentano perfino con diffusione metastatica precoce. È noto, infatti, che la diversità del comportamento biologico può influenzare la progressione del tumore; in alcuni pazienti, per esempio, la presenza di una massa intradominale è uno dei primi sintomi mentre in altri il quadro clinico è caratterizzato da metastasi ematiche a distanza (8). Si evidenzia l'esistenza di sottogruppi di pazienti in base all'aggressività e /o al comportamento biologico del tumore. In questi sottogruppi si è cercato di correlare alcune indagini istopatologiche in modo da predire il comportamento biologico del cancro. Tali indagini sono l'esame citologico (grado di atipia, indice mitotico, caratteristiche cellulari come la presenza di mucina), e la citometria a flusso del DNA. Tutti questi metodi sono considerati soggettivi, tuttavia ci sono evidenze sufficienti a considerarli predittivi per la presenza di cancro e consentirne così la loro applicazione sulle basi cliniche individuali. L'integrazione di tali metodi con la biologia molecolare del colon-retto può apportare ulteriori informazioni per una più corretta prognosi del tumore. La propagazione metastatica è sicuramente il parametro più critico per determinare la sopravvivenza in pazienti con CCR. Essa è un processo molto complesso che può essere espressione di molteplici alterazioni genetiche intra ed extra cellulari. Sono attualmente in corso progetti terapeutici allo scopo di prevenire lo sviluppo di metastasi e quindi influenzare la sopravvivenza di questi pazienti neoplastici.

Altrettanto importante per lo sviluppo delle cellule neoplastiche è il tipo di risposta dell'ospite alla crescita tumorale, per la presenza o meno d'invasione vascolare e / o linfatica e la diffusione di cellule neoplastiche ectopiche. È evidente che la maggiore conoscenza dei fattori intrinseci del cancro, associata ad uno studio più attento delle risposte biologiche dell'ospite, sono certamente dei fattori che influenzeranno positivamente la diagnostica ed il trattamento del CCR. L'enorme mole di conoscenze scientifiche correlate con le alterazioni genetiche che sono alla base del CCR e l'accertamento delle numerose cause biologiche delle metastasi, influenzeranno sicuramente sia la diagnosi sia i nuovi approcci terapeutici (9, 10). La notevole possibilità di applicare informazioni genetiche alla diagnostica clinica ed al trattamento di tali malattie rappresenta un miglioramento nella cura di tali affezioni che consente di tradurre le conoscenze della ricerca di base nella pratica clinica di tutti i giorni (11).

Materiali e metodi

Abbiamo preso in considerazione 60 pazienti consecutivi di età media di 70 anni (range compreso tra: 55 e 75 aa) sottoposti a trattamento chirurgico per carcinoma colon-rettale nel periodo 1/1/1998 al 31/7/1998, presso il Dipartimento di Chirurgia dell'Università di Pisa.

Il pezzo operatorio viene fissato in formalina tampona-

ta entro un'ora dopo la resezione chirurgica. Il prelievo del campione viene fatto nel punto di massima infiltrazione macroscopicamente valutabile.

I campioni vengono in seguito trattati secondo le normali procedure per l'allestimento delle sezioni per la diagnosi istomorfologica (disidratazione, chiarificazione, inclusione in paraffina, taglio al microtomo e colorazione con ematossilina-eosina). Lo stadio del tumore e la diagnosi istologica sono stati determinati in accordo con il sistema TNM. In base al grado istologico i tumori sono stati classificati come ben differenziati (G1), moderatamente differenziati (G2) e scarsamente differenziati (G3).

Secondo questo sistema 32 sono stati diagnosticati come T3, 17 come T2, 6 come T1 e 5 come adenomi. Sezioni successive degli stessi campioni sono state trattate secondo procedure immunoistochimiche con anticorpo anti p53 e con anticorpo CD 34 alla diluizione di 1:40.

La reazione immunoistochimica è stata condotta secondo la tecnica avidina-biotina perossidasi utilizzando il kit Vectastain ABC; una soluzione di 3-3' diaminobenzidina e perossido d'idrogeno è stata utilizzata quale substrato come rivelatore dell'anticorpo.

Risultati

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza un'iperespressione della p53 nei tumori del colon-retto diagnosticati come T3 (Fig. 1 e Fig. 2)

L'iperespressione della p53 può rappresentare un fattore prognostico genetico-molecolare nei carcinomi del colon-retto.

Si tratta di un gene soppressore tumorale localizzato sul braccio corto del cromosoma 17, il quale codifica per una fosfoproteina di 53 kDa che si accumula durante la fase G1 e migra nel nucleo durante la fase S del ciclo

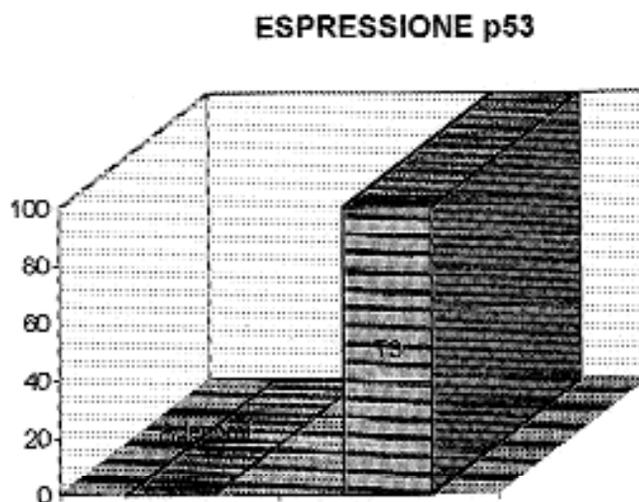


Fig. 1: Iperespressione della p53 in 32 casi di tumori del colon-retto allo stadio T3; assenza d'espressione dell'oncoproteina in 5 casi di adenomi.

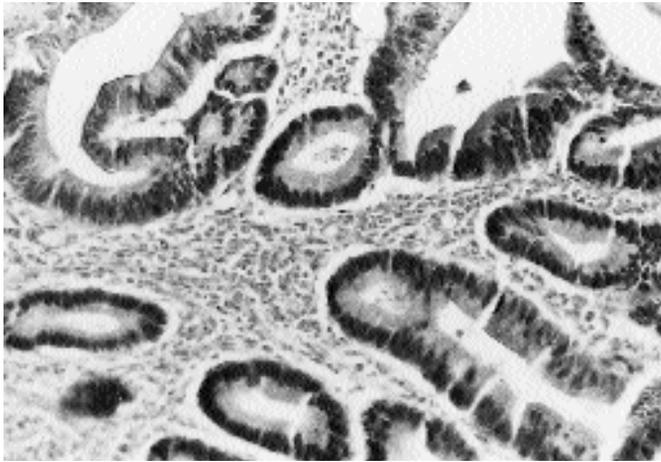


Fig. 2: Adenocarcinoma del colon sinistro moderatamente differenziato. I nuclei delle cellule neoplastiche si colorano intensamente con l'anticorpo anti-P53 (40 x).



Fig. 3: Adenoma del colon sinistro. I nuclei delle cellule non presentano nessuna reattività con P53 (10 x).

cellulare. La fosfoproteina codificata dal gene p53 si localizza preferenzialmente a livello nucleare, ma nei tessuti sani non può essere rilevata con metodiche immunostochimiche perché ha un turnover rapidissimo.

In seguito a mutazioni puntiformi dello stesso gene, viene prodotta una proteina alterata che perde la sua funzione e si accumula nel nucleo, ma in questo caso è evidenziabile con metodiche immunostochimiche.

L'espressione della p53 diventa sempre più debole quando si tratta di tumori allo stadio T2 e T1; mentre è del tutto assente quando si tratta di adenomi (Fig. 3 e Fig. 4).

La medesima correlazione, tra stadio tumorale ed espressione dell'antigene può essere fatta per il CD 34 (Fig. 5 e Fig. 6). Quest'ultimo è una molecola particolarmente importante per la differenziazione cellulare degli elementi mieloidi: è la prima a comparire sulle cellule progenitrici emopoietiche, compresi gli elementi staminali multipotenti. Questo antigene è presente anche a livello dell'endotelio, particolarmente su quello capillare.

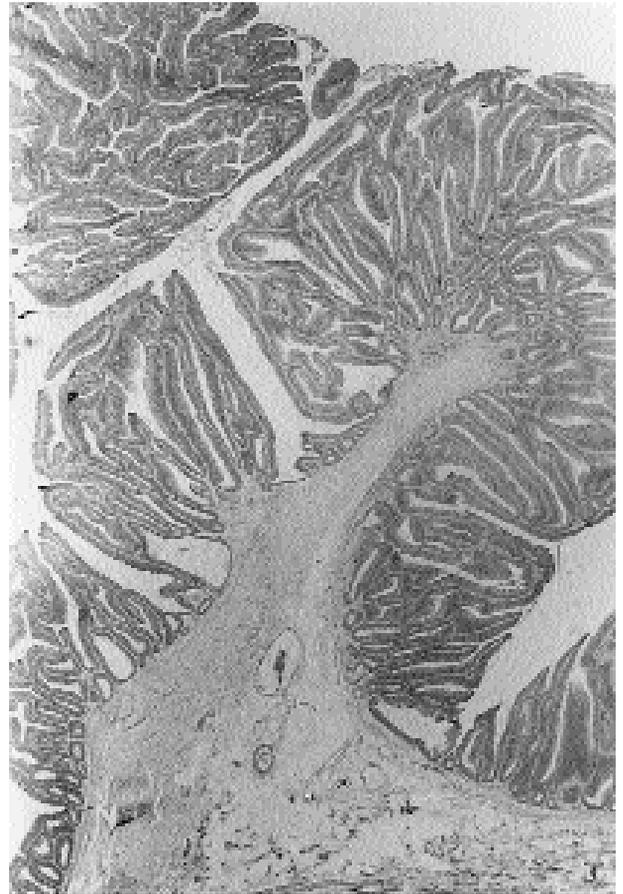


Fig. 4: Adenocarcinoma del colon sinistro. La colorazione con CD34 rivela la normale vascolarizzazione (2,5 x).

ESPRESSIONE DEL CD 34

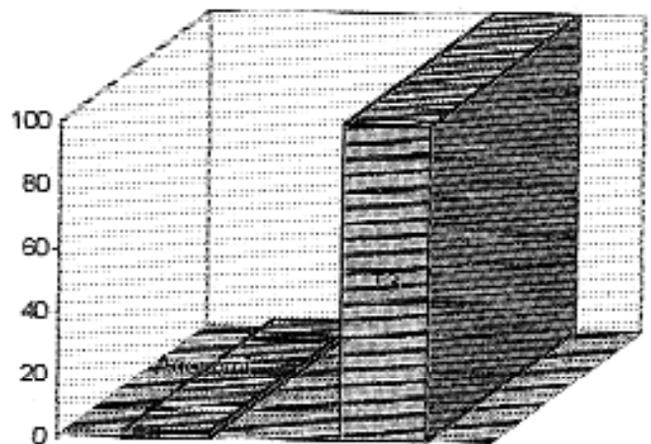


Fig. 5: Elevata espressione dell'anticorpo CD 34 in 32 casi di tumori del colon-retto, debole espressione dello stesso anticorpo in 5 casi di adenomi.

Lo studio è stato fatto su 60 pazienti con carcinoma del colon-retto; 32 di questi sono diagnosticati come T3, 17 come T2, 6 come T1 e 5 come adenomi.

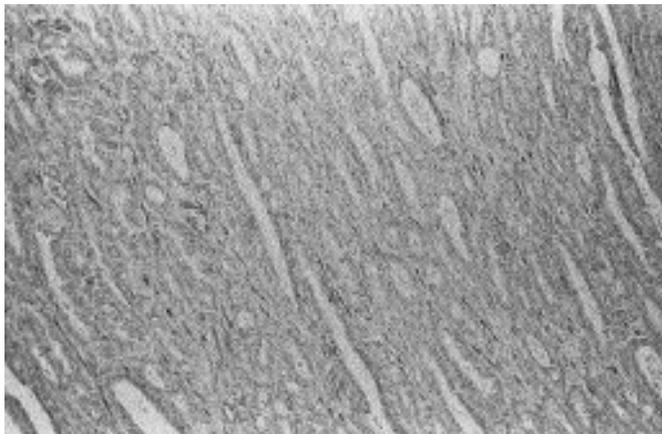


Fig. 6: Adenoma moderatamente differenziato del colon sinistro. Si noti come la colorazione con CD 34 mette in evidenza un'abbondante proliferazione vasale (2,5 x).

Discussione

Morson circa 20 anni orsono sviluppò l'ipotesi che il carcinoma del colon-retto possa prendere origine da un precursore benigno, cioè l'adenoma. Il CCR origina da lesioni precancerose come ad esempio piccoli polipi che crescono nel lume colico. A sostegno della sequenza adenoma-carcinoma vi sono alcune osservazioni di carattere biologico, epidemiologico, clinico. Numerose osservazioni a livello microscopico attestano l'esistenza di una sequenza polipo-cancro e la trasformazione ha luogo nei polipi adenomatosi. Si può presentare un epitelio displastico con vari gradi di crescita alterata ed aree di cancerizzazione nel loro contesto. Nella pratica clinica l'adenoma tubulare è il più precoce precursore del processo neoplastico, la sua osservazione è relativamente frequente così come quella delle cripte mucose aberranti. È possibile riconoscere entrambe queste lesioni a livello microscopico. L'adenoma è quindi il precursore morfologico dell'80% dei CCR ed il rischio di cancerizzazione è positivamente correlato con le dimensioni e la struttura istologica dei polipi adenomatosi. L'analisi molecolare eseguita su di essi ha dimostrato un danno irreversibile al DNA. Questo è considerato il momento genetico iniziale nella tumorigenesi del CCR. I geni responsabili di queste alterazioni biologiche neoplastiche in fase iniziale sono indicati come APC, hMSH2, K-ras2. La crescita continua dell'adenoma tubulare porta allo sviluppo della componente villosa, realizzando in tal modo un grosso polipo. Contemporaneamente all'aumento del volume coesiste una progressiva atipia citologica e strutturale. Questa condizione di displasia è progressiva e la sua cancerizzazione morfologica può presentare differenti variazioni. Infatti uno degli scopi dell'analisi genetica ed istopatologica applicata alla displasia è quello di identificare il più precocemente possibile la progressione neoplastica basata non solo su criteri morfologici soggettivi, ma anche su alterazioni genotipiche ed istopatologiche pro-

prie di ciascun tumore. L'importanza clinica del gene soppressore p 53 è stata recentemente evidenziata da un gran numero di lavori scientifici non sempre concordanti (13, 14, 15). La sua importanza è da ritenersi sia nel campo della diagnosi precoce sia nella definizione prognostica. La mutazione / perdita del gene p53 evidenzia una proteina anomala che si accumula nelle cellule neoplastiche in conseguenza dell'alterata funzione del gene. Il prodotto normale p53 è una fosfoproteina di 53 kDa; essa ha un ruolo fondamentale nel controllo del ciclo cellulare: impedirebbe alle cellule con danni genetici di entrare in fase S, bloccando il ciclo cellulare in G1 (16, 17). In sostanza la proteina p53 agisce come un oncoprotettore. In seguito a mutazioni di questo gene si produce una proteina alterata che si accumula a livello nucleare e può essere rilevata sia immunohistochimicamente che con analisi genetica (18). Una mutazione puntiforme del gene p53 è espressione del passaggio da un adenoma con alto grado di displasia ad un adenocarcinoma in situ. Il gene p53 è attualmente la più comune alterazione genetica correlata al cancro con mutazioni presenti in oltre la metà dei cancri nell'uomo. Fearon e coll. sostengono che nella progressione carcinogenetica, lo sviluppo del fenotipo maligno del CCR sia dovuto all'acquisizione di alterazioni genetiche a livello dei geni hMSH2, APC, K-ras2, DCC e p53. L'iperespressione della p53 nucleare nelle cellule epiteliali tumorali, associata ad una spiccata angiogenesi, dimostrata dalla positività al CD 34, potrebbe rappresentare un probabile fattore prognostico nei carcinomi del colon-retto allo stadio T3.

Bibliografia

- 1) Boughdady A., Kinsella A., Haboubi N., Schofield P.: *K-ras gene mutations in colorectal adenomas and carcinomas from familial adenomatous polyposis patients*. Surg, Oncol, 1:269-274, 1992.
- 2) McLellan A., Owen R., Stepniwska K., et al.: *High frequency of K-ras mutations in sporadic colorectal carcinoma*. Gut, 34:392-396, 1993.
- 3) Vivona A.A., Shpitz B., Medline A., Bmce W.R., Hay K., Ward M.A., Stern H.S., et al.: *K-ras mutations in aberrant crypt foci, adenomas and adenocarcinoma during azoxymethane-induced colon carcinogenesis*. Carcinogenesis, 14:1777-1781, 1993.
- 4) Chaubert P., Benhattar J., Saraga E., Costa J.: *K-ras mutations and p53 alterations in neoplastic and nonneoplastic lesions associated with longstanding ulcerative colitis*. Am, J, Pathol, 144:767-775, 1994.
- 5) Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E., Presinger A.C., Leppert M., Nakamura Y., et al.: *Genetic alterations during colorectal tumor development*. N, Engl, J, Med, 319:525-532, 1988.
- 6) Fearon D., Cho K., Nigro J., Kern S.E., Simons J.W., Puppert J.M., et al.: *Identifications of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers*. Science, 247:49-56, 1990.
- 7) Fearon E., Jones P.: *Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development*. FASEB, 6:2783, 1992.

- 8) Kane K.: *The genetics of colorectal carcinoma*. Ann, Clin, Lab, Science, 24:287-293, 1994.
- 9) Finkelstein S.D., Sayegh R., Bakker A., Swalsky P.: *Determination of tumor aggressiveness in colorectal cancer by K-ras2 analysis*. Arch, Surg, 128:526-532, 1994.
- 10) Pricolo V.E., Finkelstein S.D., Wu T-T., Keller G., Swalsky P.A., Bland K.I.: *Prognostic value of p53 and K-ras2 mutational analysis in stage III carcinoma of the colon*. Am, J, Surg, 171:41-46 1996.
- 11) Pricolo V.E., Finkelstein S.D., Bland K.I.: *Topographic genotyping of colorectal from a molecular carcinogenesis model to clinical relevance*. Ann, Surg, Oncol. In stampa.
- 12) Hellwig S.M., Damen C.A., van Adrichen N.P., Blijham G.H., Groewegen G., Griggon A.W.: *Endothelial CD 34 suppressed in human malignancies: role of angiogenic factors*. Cancer, Lett, 9, 120(2):203-211 1997.
- 13) Remvikos Y., Laurent-Puig P., Salmon R.J., Frelat G., Dutrillaux B., Thomas G.: *Simultaneous monitoring of p53 protein and DNA content of colorectal adenocarcinoma by flow cytometry*. Int, J, Cancer, 45:450-456, 1990.
- 14) Bartek J., Bartkova J., Vojtesek B., Staskova Z., Lukas J., Kovarik J., et al.: *Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies*. Oncogene, 6:1699-1703, 1991.
- 15) Eane D.P.: *p53 guardian of the genoma*. Nature, 358:15-16, 1992.
- 16) Nigro J.M., Baker S.J., Presinger A.C., Jessup J.M., Hostetter R., Cleary K., et al.: *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor type*. Nature, 342:705-708, 1989.
- 17) Kastan M.B., Onyekere O., Sidransly D., Vogelstein B., Craig R.W.: *Partecipations of p53 protein in the cellular respons to DNA damage*. Cancer, Res, 51:6304-6311, 1991.

Autore corrispondente:

Prof. Roberto SPISNI
Via Roma, 67
56100 PISA

