

Alterazione della espressione delle tubuline cellulari alfa e beta in pazienti affetti da cancro coloretale di tipo sporadico

G. MIDIRI*, E. GIARNIERI^{o*}, A. COVOTTA^{***}, G. SODA^o, G. TUCCI^{**}, F. CONSORTI^{***}, M. PACELLA^{o**}, S. GIDARO^{o**}, L. COVOTTA^{***}, L. LUZZATTO*, V.A. CIROLLA^{o*}, S. CONTE*, G. MARINO*, A. VECCHIONE^{o*}, V. BELTRAMI^{***}

RIASSUNTO: Alterazione della espressione delle tubuline cellulari alfa e beta in pazienti affetti da cancro coloretale di tipo sporadico.

G. MIDIRI, E. GIARNIERI, A. COVOTTA, G. SODA, G. TUCCI, F. CONSORTI, M. PACELLA, S. GIDARO, L. COVOTTA, L. LUZZATTO, V.A. CIROLLA, S. CONTE, G. MARINO, A. VECCHIONE, V. BELTRAMI

Gli Autori indagano sul significato clinico-patologico della alterazione delle tubuline alfa e beta, componenti dei microtubuli del citoscheletro delle cellule della mucosa colica, in 16 pazienti operati per cancro colo-rettale di tipo sporadico.

Essi valutano l'alterazione dell'espressione proteica delle tubuline alfa e beta nelle cellule della mucosa tumorale colica, in tessuti asportati chirurgicamente, mediante metodica immunocitochimica attraverso l'impiego di anticorpi monoclonali specifici.

La perdita di espressione delle tubuline alfa e beta è stata riscontrata nel 56,2% dei soggetti esaminati, mentre l'alterazione isolata della tubulina alfa è stata riscontrata nell'81,2% dei pazienti.

Tali dati sembrano concordare con quelli sperimentali di Porter, che ha recentemente ipotizzato che l'alterazione delle strutture microtubulari sarebbe da interpretare come espressione della risposta cellulare al danno del DNA e quindi alla degenerazione in senso neoplastico di un compartimento cellulare.

SUMMARY: Cellular microtubule structural alteration in sporadic colorectal cancer patients.

G. MIDIRI, E. GIARNIERI, A. COVOTTA, G. SODA, G. TUCCI, F. CONSORTI, M. PACELLA, S. GIDARO, L. COVOTTA, L. LUZZATTO, V.A. CIROLLA, S. CONTE, G. MARINO, A. VECCHIONE, V. BELTRAMI

The aim of this preliminary report is to evaluate alfa and beta tubulins, components of cellular microtubules, altered expression in sporadic colorectal cancer patients.

The Authors considered 16 patients who underwent surgery for sporadic colorectal carcinoma with radical intent.

Alfa and beta tubulins were evaluated in tumoral mucosa by immunohistochemistry.

In 56.2% of the examined patients a low expression of alfa and beta tubulins was showed while the alteration of alfa tubulin was showed in 81.2% of the patients.

This finding supports the hypothesis of Porter that alterations in microtubule structure might be part of the cellular response to DNA damage.

KEY WORDS: Cancro coloretale di tipo sporadico - Tubuline alfa e beta - Immunocitochimica.
Sporadic colo-rectal cancer - Alfa and beta tubulins - Immunohistochemistry.

Università degli Studi "La Sapienza" - Roma
II Facoltà di Medicina e Chirurgia
* Chirurgia Generale B - Ospedale Sant'Andrea
(Direttore: Prof. L. Angelini)

Università degli Studi "Tor Vergata" - Roma
**Dipartimento di Chirurgia
(Direttore: Prof. A.M. Farinon)

Università degli Studi "La Sapienza" - Roma
Policlinico Umberto I^o - I Facoltà di Medicina e Chirurgia

***Dipartimento di Scienze Chirurgiche "F. Durante"-Sez. di Chirurgia Generale e Toracica
(Direttore: Prof. V. Beltrami)

^oDipartimento di Medicina Sperimentale
(Direttore: Prof. M. Piccoli)

Università degli Studi "La Sapienza" - Roma
II Facoltà di Medicina e Chirurgia

**Oncologia - Ospedale Sant'Andrea
(Direttore: Prof. A. Vecchione)

Università di Chieti-Pescara
***Dipartimento di Scienze Chirurgiche
(Direttore: Prof. G. Gidaro)

By Grant of Mur

© Copyright 2003, CIC Edizioni Internazionali, Roma

Premessa

In Italia si registrano circa 28.000 nuovi casi di cancro del colon-retto per anno, di cui circa il 60% in età compresa tra i 60 ed i 65 anni (9).

Per di più, sulla scorta di dati attuariali, è attesa una crescita della prevalenza di tale malattia nei prossimi cinque anni.

Recenti studi epidemiologici hanno mostrato che la oncogenesi di varie neoplasie è dovuta ad alterazioni di specifici geni, mentre la crescita consegue a multiple mutazioni geniche (8).

Per quanto attiene ai cancri del colon-retto, recenti progressi in ambito di genetica molecolare mostrano che i geni hMSH2 ed hMLH1 del gruppo dei geni di riparazione del DNA (sistema MMR) sono implicati nella etiologia dei cancri colo-rettali di natura ereditaria non associati a poliposi (HNPCC - Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer) (6-12).

Nelle poliposi ereditarie familiari (FAP - Familial Adenomatous Polyposis) la sequenza morfo-istologica dalle cripte aberranti (ACF - Aberrant Crypts Foci), oggi stimate come la prima alterazione morfologica per tutti i tipi di cancro colo-rettale, all'adenocarcinoma è correlata ad una mutazione del gene APC attraverso una alterazione del tipo "stop-codon" (9-11).

FAP ed HNPCC rappresentano però soltanto il 5% di tutti i cancri del colon-retto mentre per i cosiddetti cancri di tipo sporadico, che rappresentano la maggioranza percentuale dei casi, l'oncogenesi, l'evoluzione da precursori potenziali, i criteri di stadiazione e i piani di trattamento vengono attualmente approfonditi.

Sfortunatamente l'alterazione del sistema MMR non è specifica e quindi non vi è alcuna conferma che questa sia l'unica via oncogenetica per i cancri colo-rettali di qualunque tipo.

Resta comunque ancora valida per i cancri colo-rettali l'ipotesi oncogenetica sostenuta da Volgstein, in base alla quale ad una mutazione genica originaria segue un danno del DNA e l'impossibilità di una sua riparazione e quindi una cascata mutazionale con susseguenti alterazioni geniche (5-11).

Ciò peraltro spiega la eterogeneità clonale dei cancri colo-rettali pur a parità di tipo istologico e di grado di differenziazione cellulare (11).

Recentemente ha destato grande interesse lo studio di Porter che ha potuto dimostrare sperimentalmente come l'alterazione di componenti del citoscheletro, quali le tubuline alfa e beta, sia l'espressione di una risposta ad un danno del DNA e quindi ad una potenziale trasformazione in senso neoplastico della cellula (4).

Scopo del nostro studio è quindi stato quello di documentare la presenza di una alterazione delle tubuline alfa e beta nella mucosa colica di pazienti operati per cancro colo-rettale di tipo sporadico, al fine di validare sul piano clinico il lavoro sperimentale di Porter.

Pazienti e metodi

Abbiamo considerato 16 pazienti operati per cancro colo-rettale di tipo sporadico, in quanto non erano affetti da poliposi familiare e non rispondevano ai criteri di Amsterdam o Bethesda per una sindrome neoplastica ereditaria non accompagnata da poliposi, di età inferiore ai 60 anni; 11 erano di sesso maschile e 5 di sesso femminile.

Circa la localizzazione della malattia, 5 dei casi esaminati erano affetti da cancro del colon destro e per essi venne eseguita

una emicolectomia destra; 8 casi erano localizzati al colon sinistro o al sigma, e per essi venne confezionata una emicolectomia sinistra; 5 casi presentavano una localizzazione rettale e per essi fu eseguita una resezione anteriore del retto.

Per ciò che attiene alla stadiazione, nessun caso corrispondeva ad una classificazione T1, 9 casi furono classificati come T2 e 7 casi come T3, mentre in 6 casi fu possibile riscontrare un coinvolgimento dei linfonodi locoregionali.

Circa il grado di differenziazione cellulare, un caso venne tipizzato come G1, 9 casi come G2 e 6 casi come G3.

Lo studio delle tubuline alfa e beta è stato effettuato sulla mucosa neoplastica, su campionature di pezzi asportati chirurgicamente, e quindi valutata mediante metodica immunohistochimica attraverso l'impiego di anticorpi monoclonali specifici.

È stata valutata come negativa la completa assenza di immunoreattività all'anticorpo testato; debolmente positiva (+) la reattività comprovabile in un numero di cellule inferiore al 10%; moderatamente positiva (++) se dimostrabile in un compartimento cellulare tra il 10 ed il 50%; fortemente positiva (+++) se comprovata in più della metà delle cellule contenute nei preparati.

Comunque è stata valutata positiva, e quindi non alterata, la presenza di tubuline alfa e beta soltanto nei casi etichettati come ++ e +++.

Risultati

Dei 16 casi esaminati, 13 (81,2%) presentavano una perdita completa o una scarsa espressione di tubuline alfa; ma soltanto in 9 su 16 casi (56,2%) era presente la mancata o scarsa espressione di ambedue le tubuline.

Nessun caso presentava la mancata espressione di tubuline beta senza la concomitante assenza di tubuline alfa; il dato inverso è stato invece riscontrato in 4 casi, come si può facilmente desumere dai dati presentati.

Non è stato possibile documentare alcuna altra correlazione significativa con il sesso e l'età dei pazienti, la localizzazione della neoplasia, l'estensione locoregionale, il coinvolgimento linfonodale o il grado di differenziazione cellulare.

Tutti i casi esaminati sono stati avviati al follow up secondo routine onde poter estrapolare eventuali dati circa la valutazione prognostica di questa serie di pazienti.

Discussione

Il citoscheletro delle cellule della mucosa colica, così come quelli di altri distretti specializzati, è costituito da filamenti di actina, filamenti cosiddetti intermedi e microtubuli.

I microtubuli sono costituiti dalla polimerizzazione di strutture proteiche identificate come tubuline alfa e beta.

Alcuni autori hanno peraltro identificato, anche se non in tutti i compartimenti cellulari, la presenza di strutture proteiche identificate come tubuline gamma, implicate nella formazione dei microtubuli.

I microtubuli hanno un ruolo fondamentale nel regolare le mitosi cellulari.

Porter ha potuto dimostrare in un suo recente studio sperimentale come i microtubuli siano riscontrati alterati in risposta ad una alterazione strutturale del DNA cellulare (10).

Il riscontro di una alterazione di queste strutture nelle sue due componenti alfa e beta in oltre il 56% dei casi da noi considerati, affetti da cancro del colon-retto, costituisce una applicazione clinica di supporto ai dati sperimentali di Porter.

Tale percentuale sale all'81,2% dei casi se si considera la sola alterazione della tubulina alfa, che comunque dimostra una alterazione della struttura microtubulare.

Abbiamo ritenuto opportuno segnalare questi nostri risultati preliminari in quanto originali ed anche in considerazione della scarsa letteratura rilevata sull'argomento in questione.

C'è comunque certamente bisogno di suffragare

con altri parametri queste nostre iniziali valutazioni.

In precedenti lavori abbiamo potuto dimostrare come l'alterazione dell'espressione del gene hMSH2, un componente del sistema di riparazione del DNA, risulta alterato non solo in pazienti affetti da cancri di tipo eredo-familiare, ma anche in pazienti affetti da forme di tipo sporadico (2-8).

Recentemente è stata individuata una nuova classe di geni (*histidine triad family*), un componente della quale, il gene Fhit, viene riscontrato alterato in percentuali superiori al 50% dei cancri coloretali (1, 4, 3, 7).

I nostri prossimi studi verranno incentrati sull'esame contestuale delle possibili correlazioni tra componenti dei microtubuli del citoscheletro cellulare (tubuline alfa e beta), geni del sistema di riparazione del DNA (in particolare hSMH2) e gene Fhit, nel tentativo di identificare in maniera quanto più completa almeno una delle possibili *pathway* oncogenetiche dei cancro colo-rettali di tipo sporadico.

Bibliografia

1. Einatan J, Murphy D, Goh HS, et al.: Hit family genes: Fhit but not PKCI-1/HINT produces altered transcripts in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 81: 874.
2. Giarnieri E, Consorti F, Midiri G, et al.: Altered expression of hMSH2 in sporadic colorectal cancer, surrounding mucosa and at distant colonic mucosa. *Anticancer Res* 2000; 20: 3829.
3. Hao XP, Willis JE, Pretlow TG, et al.: Loss of fragile histidine triad expression in colorectal carcinomas and premalignant lesions. *J Cancer Res* 2001; 60:18.
4. Hibi K, Taguchi M, Nakamura H, et al.: Alternative splicing of the Fhit gene in colorectal cancers. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88: 385.
5. Kinzler WK, Vogelstein B: Landscaping the cancer terrain. *Science* 1998; 280:1036.
6. Lynch HT, myrk T: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. An update review. *Cancer* 1996; 78: 1149.
7. Mady HH, Melhem MF: Fhit protein expression and its relation to apoptosis, tumor histologic grade and prognosis in colorectal adenocarcinoma: an immunohistochemical and image analysis study. *Clin Exp Med* 2002; 19: 351.
8. Midiri G, Consorti F, Giarnieri E, et al.: Advances in molecular genetics and clinical implications of sporadic colorectal cancer: when the surgeon can help the pathologist. In *Advances in abdominal surgery* ed. Kluwer Ac. Publisher Dordrecht (NE) 2002; 13: 191.
9. Nucci M R, Robinson CR, Longo P, et al.: Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum Pathol* 1997; 28: 396.
10. Porter LA, Lee JM: Alfa , Beta and gamma tubulin, polymerization in response to DNA damage. *Exp Cell Res* 2000; 270:151.
11. Plyak K, Hamilton SR, Vogelstein B, et al.: Early alteration of cell-cycle regulated gene expression in colorectal neoplasia; *Am J Pathol* 1996; 149: 381.
12. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR: Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525.