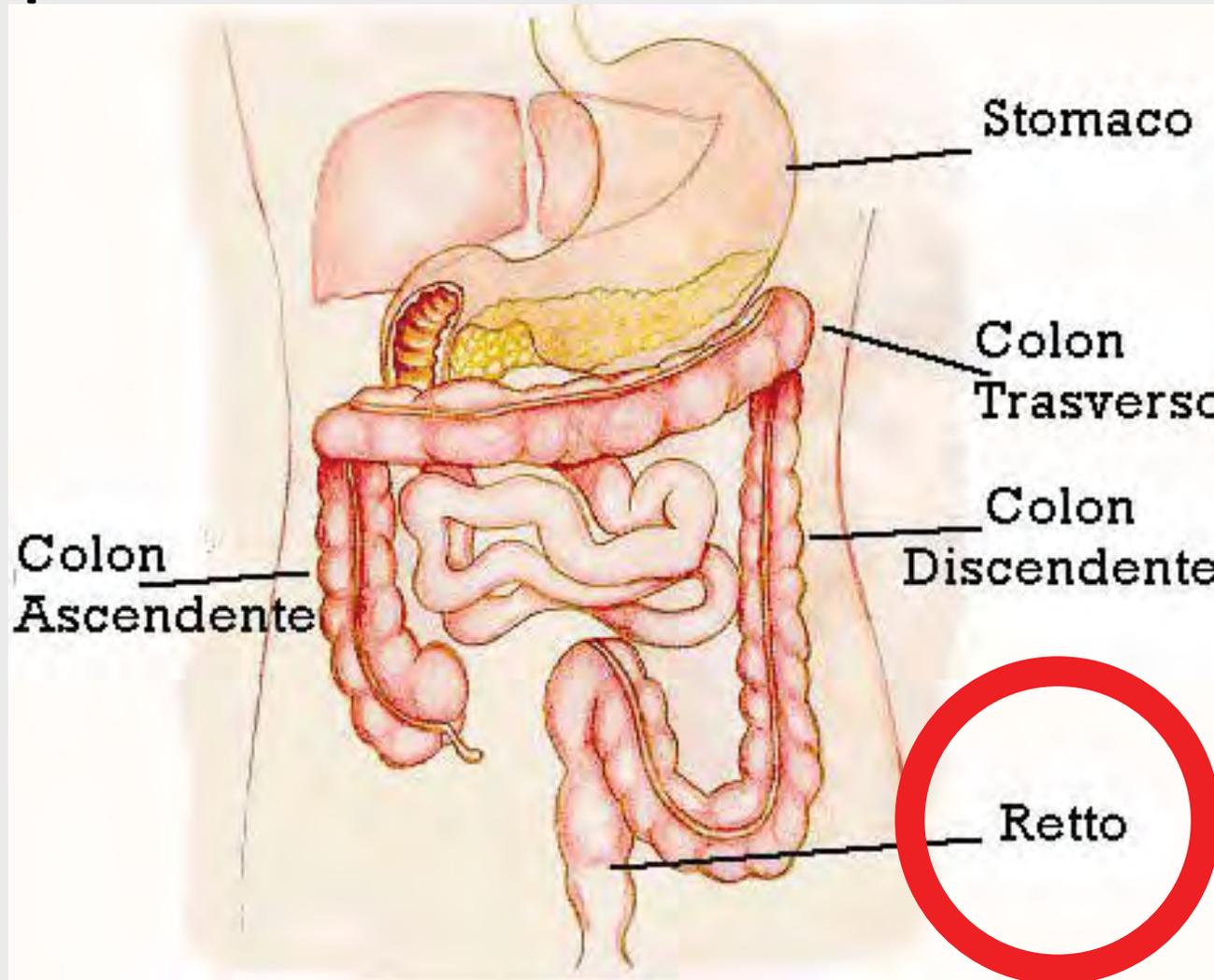


FATTORI PROGNOSTICI E PREDITTIVI ANATOMOPATOLOGICI NEI TUMORI DEL COLON-RETTO



Paolo De Giuli
Anatomia Patologica ASL CN2

La radio-chemioterapia neoadiuvante (CRT) seguita da escissione totale del mesoretto è il trattamento di scelta per il carcinoma rettale in stadio II o III



Remarks

- Circa il 60% dei pazienti con CRT neoadiuvante ottiene un downstaging patologico ma solo il 10-15% raggiunge la regressione completa.
- Esistono differenze intrinseche di radiosensibilità.
- Nonostante i progressi del trattamento multimodale frequenza di recidiva del tumore, morbilità e mortalità rimangono alte.

Questions

- 1. È possibile prevedere la risposta del tumore alla chemio-radioterapia neoadiuvante?**
- 2. È possibile indurre o potenziare la radiosensibilità del tumore?**
- 3. Quali sono le modificazioni patologiche indotte sul tumore dalla chemio-radioterapia neoadiuvante?**

**È possibile prevedere la
risposta del tumore alla
chemio-radioterapia
neoadiuvante?**

Perché?

1. per ridurre i costi in modo significativo
2. per evitare gli effetti tossici collaterali di una terapia non necessaria in un tumore intrinsecamente radioresistente
3. per proporre precocemente modalità alternative di trattamento adiuvante
4. per utilizzare caratteristiche molecolari del tumore come potenziali bersagli di nuovi farmaci
5. per (eventualmente) evitare, nei pazienti con risposta patologica completa alla CRT neoadiuvante, un trattamento chirurgico demolitivo

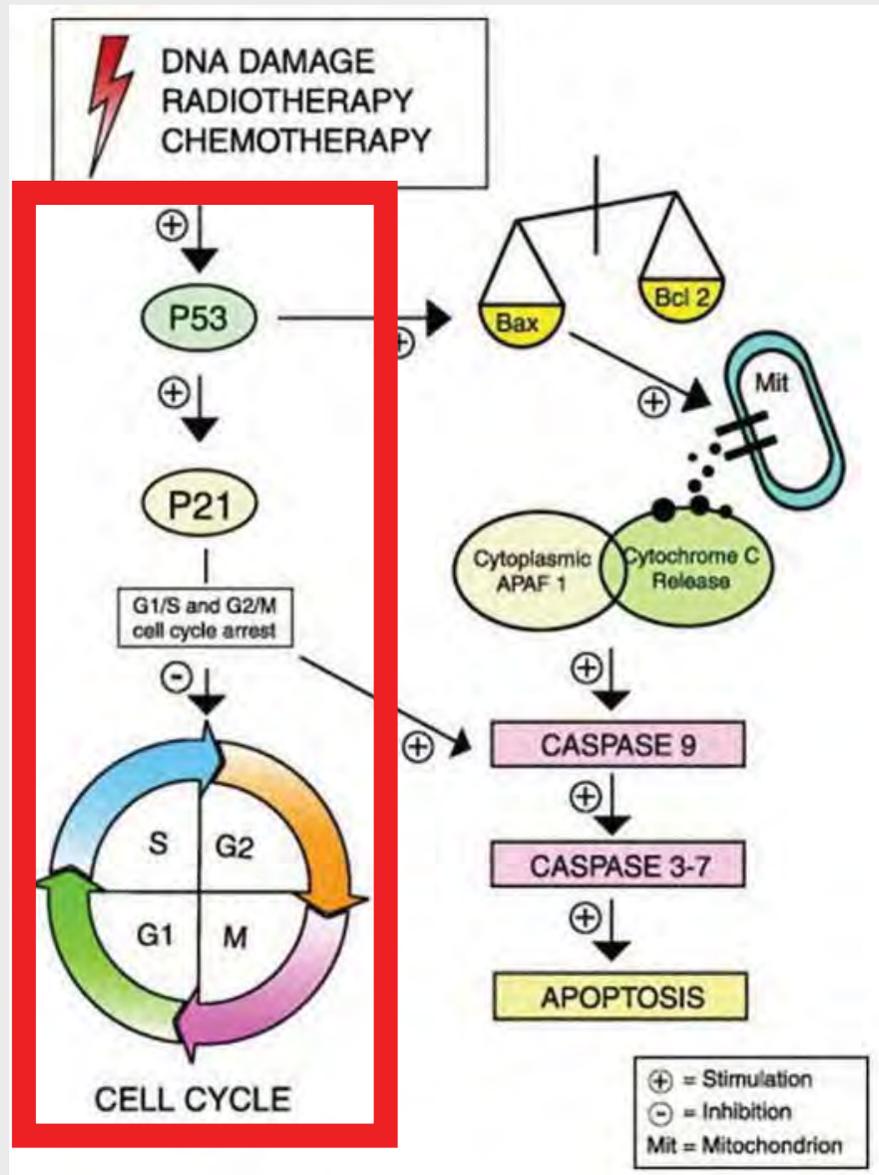
La valutazione dei profili di espressione genica indica che la maggior parte dei geni correlati a chemio-radiosensibilità è associata a:

- proteine del ciclo cellulare**
- meccanismi di riparazione del DNA**
- fattori di crescita**
- segnali di trasduzione**
- molecole di adesione, invasione e metastasi**
- molecole di angiogenesi e fenomeni di ipossia**
- apoptosi**

Regolatori del ciclo cellulare

- **p53 (guardiano del genoma):** agisce mantenendo durante il ciclo cellulare i normali checkpoint tra le fasi G1/S e G2/M. Al rilevamento del danno p53 blocca la cellula in uno dei due checkpoint e, se necessario, la avvia al processo di apoptosi. Mutazioni di p53 identificate con sequenziamento genico (non con IHC) sono associate ($p < 0,0001$) a radioresistenza.
- **p21:** è un membro del pathway di segnali di p53. Viene attivata da p53 in conseguenza di un danno al DNA causato ad es. da radiazioni ionizzanti e causa arresto del ciclo cellulare e apoptosi.

Regolatori del ciclo cellulare

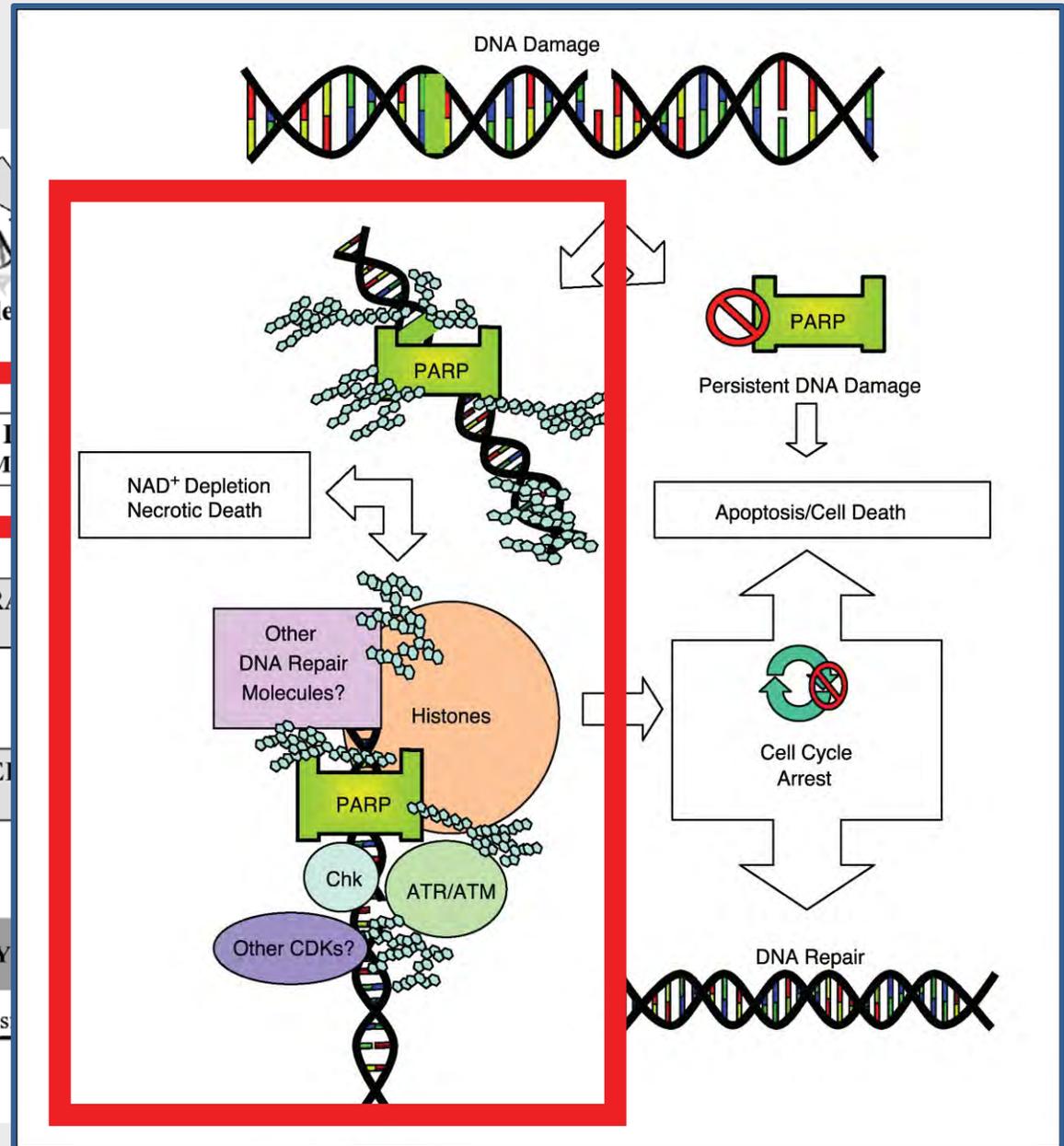
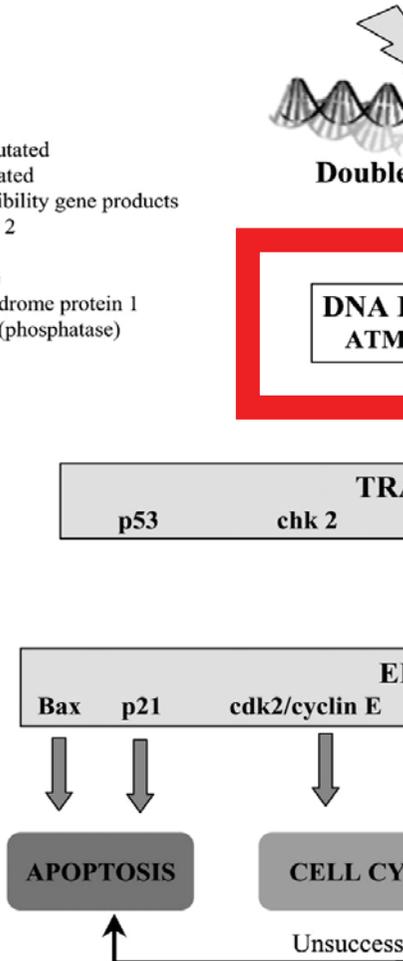


Meccanismi di riparazione del DNA

- **ATM kinasi (Ataxia Teleangiectasia Mutated):** gioca un ruolo nell'identificazione di rotture della doppia elica del DNA causate da radiazioni e, attivata da queste lesioni, fosforila una serie di proteine effettrici nella cascata di segnali che coordina l'arresto del ciclo cellulare e la riparazione del DNA. Le mutazioni di ATM causano la malattia ataxia-teleangiectasia, malattia associata a multipli difetti cellulari tra cui una aumentata sensibilità alle radiazioni ionizzanti.
- **DNA-PK:** ripara le DNA Double-Strand Breaks (DSBs) indotte da radiazioni ionizzanti; agisce legando le estremità terminali del DNA interrotto.
- **PARP-1 (Poly [ADP-ribose] polymerase 1):** identifica le DNA Single-Strand Breaks (SSBs) e le ripara mediante un processo di escissione di basi. Collabora nella riparazione delle più letali DSBs. Interagisce con BRCA1 e BRCA2.
- **Instabilità dei microsatelliti (difetto delle proteine del sistema mismatch repair).** I tumori con tale difetto hanno migliore prognosi.

Meccanismi di riparazione del DNA

ATM – Ataxia telangiectasia mutated
 ATR – Ataxia telangiectasia related
 BRCA1 – breast cancer susceptibility gene products
 Cdk2 – cyclin dependent kinase 2
 Chk 2 – Checkpoint kinase 2
 DNA-PK – DNA protein kinase
 NBS1 - Nijmegen breakage syndrome protein 1
 pCdc25 - cell division cycle 25 (phosphatase)

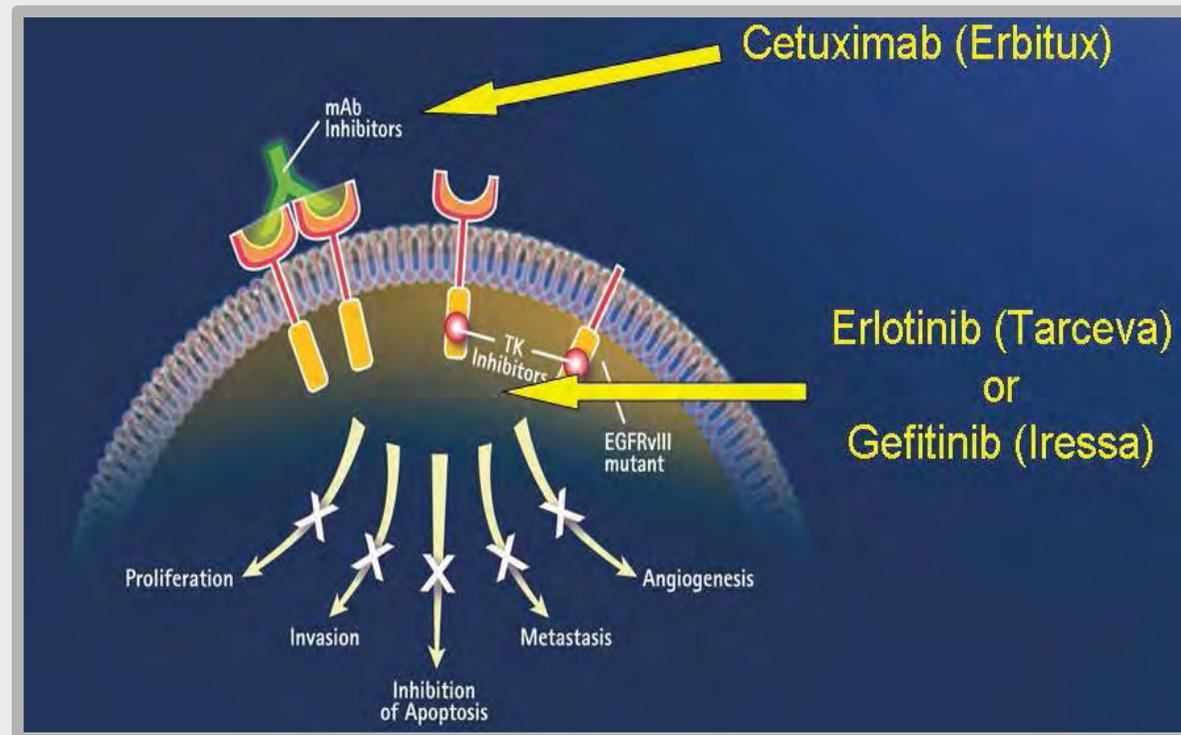


Markers di proliferazione e indice mitotico

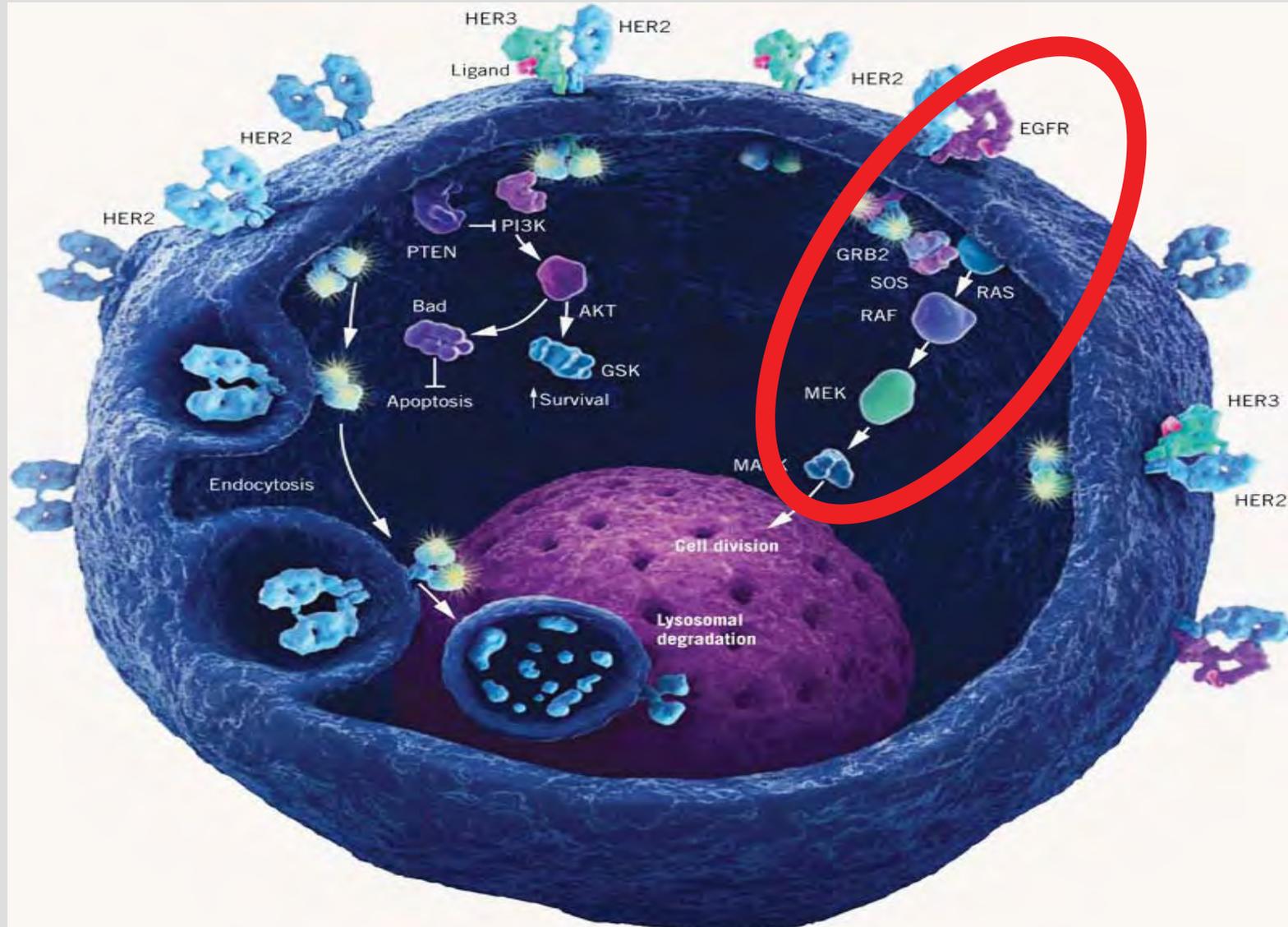
- **Alti livelli di antigene nucleare Ki-67, e quindi alto indice proliferativo delle cellule tumorali su biopsie pre-CRT neoadiuvante, sono correlati con un migliore downstaging tumorale.**
- **Un alto indice proliferativo nei campioni post-CRT è invece un indice prognostico sfavorevole.**

Fattori di crescita

L'epidermal growth factor receptor (EGFR) è coinvolto in numerosi eventi cellulari, quali proliferazione, differenziazione, apoptosi... L'overespressione di EGFR è associata a resistenza a RT. Molecole bloccanti EGFR sono efficaci nel trattamento del tumore colorettales.



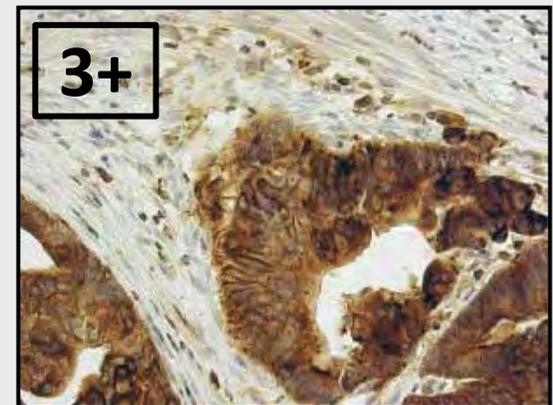
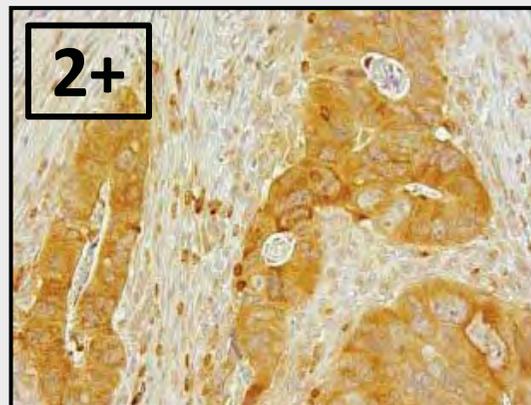
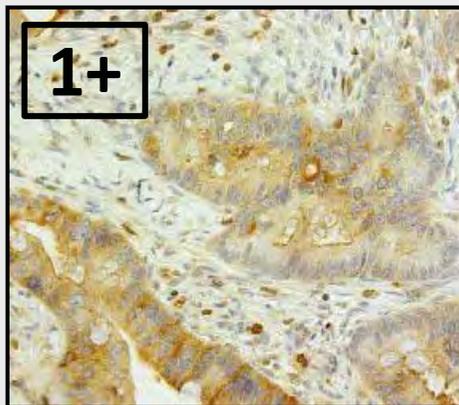
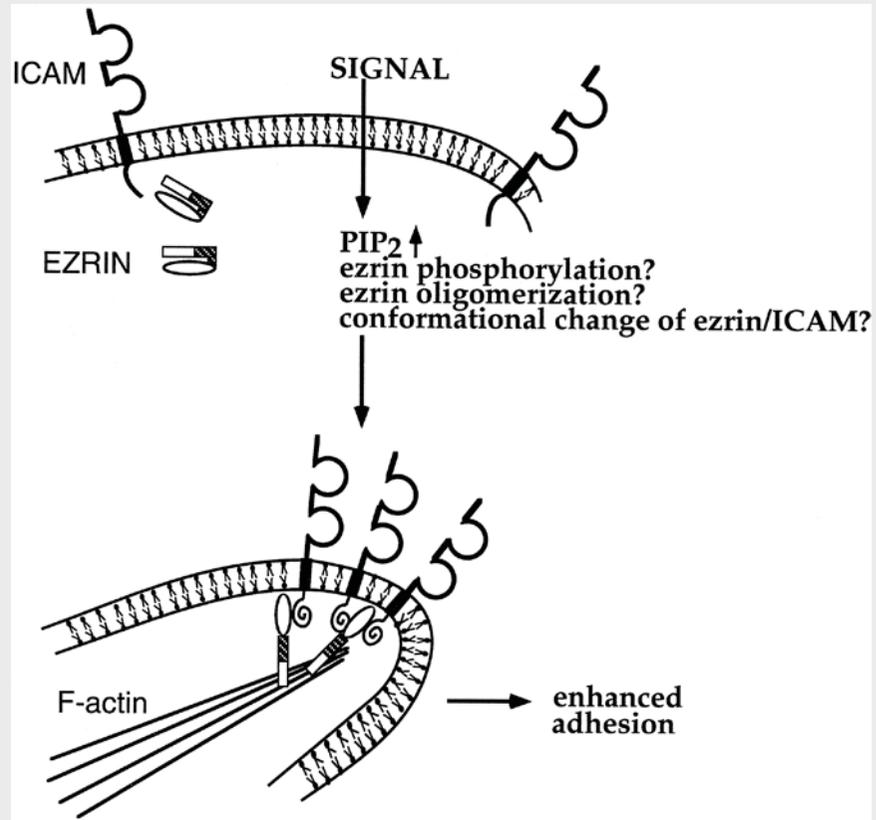
Fattori di crescita



Molecole di adesione, invasione, metastasi

- La capacità di invadere e di metastatizzare è una caratteristica della crescita maligna. Prerequisito è una ridotta adesione cellula-cellula e cellula-matrice. Tra le proteine che legano il citoscheletro alla membrana vi sono quelle della famiglia ERM (Ezrina, Radixina e Moesina). La funzione è agganciare la membrana all'actina citoplasmatica. Tale legame è coinvolto in diverse funzioni cellulari, quali l'adesione, la fagocitosi, l'apoptosi. Bassi livelli di ezrina (citovillina) nelle biopsie pre-CRT indicano una prognosi favorevole e una migliore risposta alla terapia.
- COX2 è un enzima che catalizza la conversione di acido arachidonico in prostaglandine. È un importante mediatore dell'invasione e della metastatizzazione del tumore. Le cellule tumorali esposte a radiazioni usano COX2 per produrre prostaglandine, ed in particolar modo PGE2. Le prostaglandine rappresentano per la cellula fattori di protezione contro la morte cellulare radio-indotta. L'overespressione di COX2 nelle biopsie pre-trattamento CRT è associata con una scarsa risposta e con una prognosi sfavorevole.

Ezrin



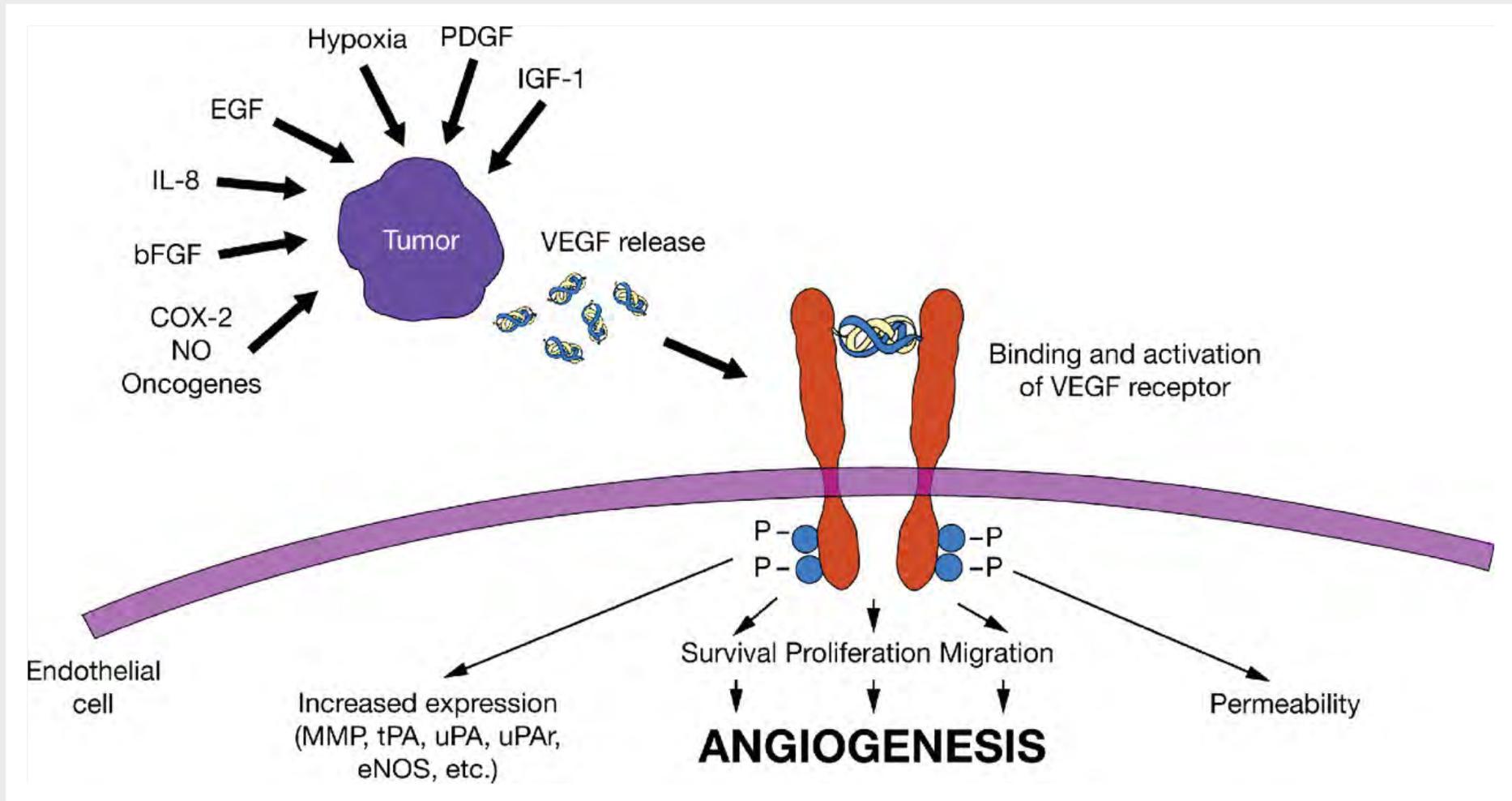
Fattori angiogenetici e ipossia

L'ipossia tumorale, privando le cellule di ossigeno che è elemento essenziale per l'attività citotossica, induce radio-chemioresistenza.

L'ipossia promuove inoltre l'up-regolazione di fattori angiogenetici i quali a loro volta incrementano la proliferazione cellulare.

- **VEGF: bassi livelli di vascular endothelial growth factor correlano con una migliore radioresponsività del tumore rettale.**
- **L'ipossia previene la degradazione dell'HIF-1 α (fattore 1 α ipossia-inducibile). HIF-1 α stimola la proliferazione cellulare e, per mezzo del VEGF, l'angiogenesi. Tumori con elevata espressione di HIF-1 α hanno minori possibilità di regressione in seguito a CRT.**

Fattori angiogenetici e ipossia



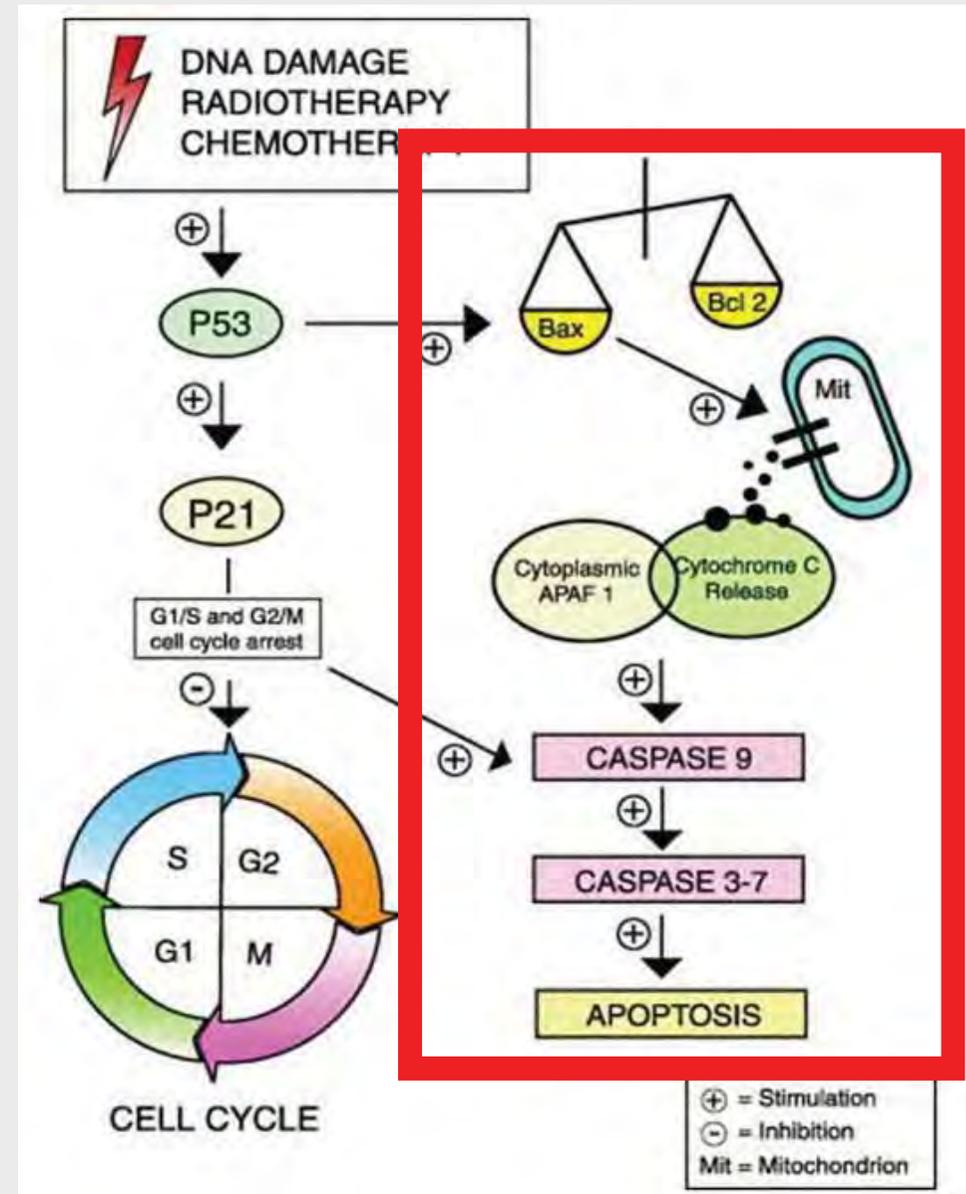
Markers di apoptosi

- **Bax:** è una proteina pro-apoptotica appartenente alla famiglia delle proteine Bcl-2. La sua espressione induce permeabilità mitocondriale, che porta al rilascio di Cytocrome C e all'inizio di una reazione a cascata che promuove la degradazione del DNA e la morte cellulare. La perdita dell'espressione di Bax contribuisce alla farmaco-radio resistenza nei carcinomi coloretali. La sua overespressione incrementa la sensibilità alla chemio-radioterapia, potenziando l'induzione della morte cellulare programmata.
- **Bcl-2:** inibisce l'apoptosi cellulare. L'overespressione di Bcl-2 è stata correlata con multi-farmacoresistenza e con riduzione dell'apoptosi indotta dalle radiazioni ionizzanti.

Markers di apoptosi

I tumori le cui cellule mantengono meccanismi apoptotici funzionanti sono più sensibili alla chemio-radioterapia

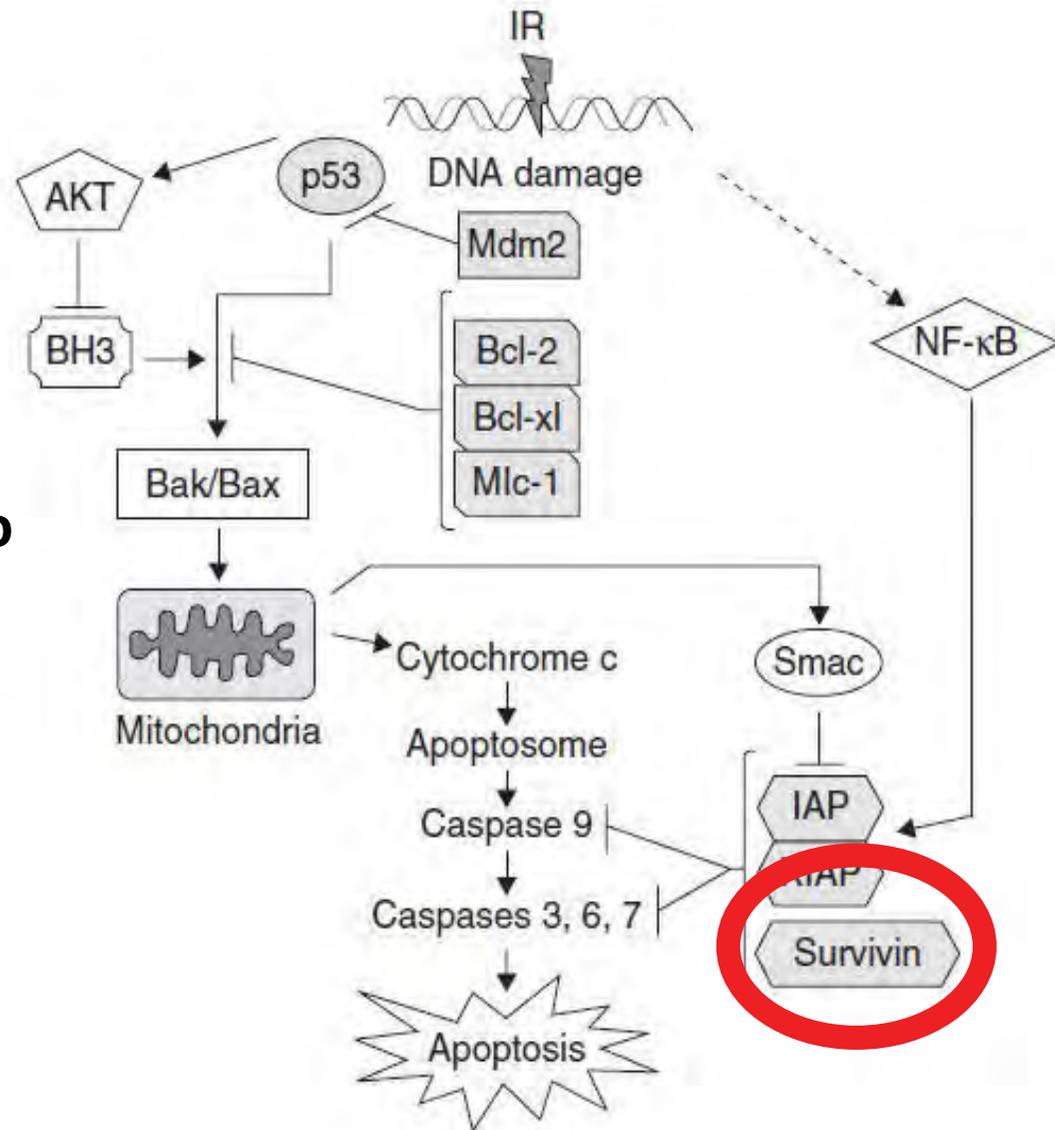
Al contrario, difetti nei meccanismi apoptotici rendono le cellule tumorali più resistenti alla CRT



Markers di apoptosi

Survivin è un'altra molecola anti-apoptotica, come Bcl-2. Agisce più a valle, inibendo alcune caspasi.

Vi è correlazione fra over-espressione di survivin e radio-chemioresistenza.



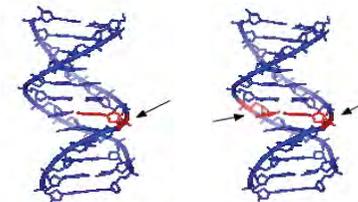
**È possibile indurre o
potenziare la
radiosensibilità del tumore?**

Agenti radiosensibilizzanti: targets molecolari

Includono componenti di pathways coinvolte in:

- meccanismi di riparazione dei danni al DNA provocati da radiazioni ionizzanti**
- segnali di sopravvivenza e di crescita cellulare**
- protezione dall'apoptosi radio-indotta**
- promozione dell'angiogenesi tumorale**

Targets molecolari per indurre radiosensibilizzazione in un tumore ...



TARGET MOLECOLARE	RUOLO NELLA RADIORESISTENZA TUMORALE	AGENTI TARGETING ED EFFETTI COLLATERALI
ATM kinasi (Ataxia Teleangiectasia Mutated)	Identifica e ripara le DSBs indotte da RI	KU-55933, CP466722, ATM inhibitor, NBS-1 peptide Rischio di tumori secondari
DNA-PK	Ripara le DSBs indotte da RI legando le due estremità terminali del DNA rotto	IC87361, NU7441, KU-0060648, Dbait Rischio di tumori secondari
Chk-1	Arresta il ciclo cellulare a livello del checkpoint S/G2, permettendo la riparazione del DNA (nelle cellule con p53 difettosa)	A-690002, A-641397, Chir-124, PF-477736 Mielosoppressione, rischio di tumori secondari
PARP-1	Identifica le SSBs e le ripara con un processo di escissione di basi. Collabora nella riparazione delle più letali DSBs	AG14361, AG14447, ABT-888, GPI15427, GPI21016, CEP9722 Arresto riparazione del DNA nelle cellule normali

... targets molecolari per indurre radiosensibilizzazione in un tumore ...

TARGET MOLECOLARE	RUOLO NELLA RADIORESISTENZA TUMORALE	AGENTI TARGETING ED EFFETTI COLLATERALI
EGFR	Promuove la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali e attiva DNA-PK dopo esposizione a RI	Cetuximab, Erlotinib, Gefitinib, BIBW-2992 Rash e altri effetti cutanei. Alcune resistenze (mutaz. di K-Ras, B-Raf)
PI3K AKT	Protezione e sopravvivenza delle cellule tumorali dopo RI	PX-866, PI-103 P529, Nelfinavir Iperglicemia
NF-kB	Fattore di trascrizione coinvolto nella promozione della sopravvivenza, nello sviluppo e nella progressione del tumore	Bortezomib, DHMEQ Immunosoppressione
p53	La sua inattivazione provoca un difetto nell'apoptosi indotta dalle radiazioni ionizzanti	PRIMA-1met, Nutlin-3 Mielosoppressione

... targets molecolari per indurre radiosensibilizzazione in un tumore

TARGET MOLECOLARE	RUOLO NELLA RADIORESISTENZA TUMORALE	AGENTI TARGETING ED EFFETTI COLLATERALI
Bcl-2	Protezione delle cellule tumorali dall'apoptosi indotta dalle RI	HA14.1, R(-)gossypol, ABT-737, ABT-263 Linfopenia e trombocitopenia
XIAP	Protezione delle cellule tumorali dall'apoptosi (inibisce le caspasi)	AEG35156, SH-130, 1396-11 Trombocitopenia
Survivin	Protezione delle cellule tumorali dall'apoptosi (inibisce le caspasi)	LY2181308, SPC3042, YM155 Infiammaz. mucose e neutropenia
HDAC (histone deacetylase)	Modulazione di alcune proteine coinvolte nell'apoptosi e nei meccanismi di riparazione del DNA	Trichostatin A, SAHA, LBH589 Lievi multipli effetti collaterali
HSP-90	Modulazione di proteine coinvolte nell'apoptosi, nella riparazione del DNA, nella risposta all'ipossia	17-DMAG, Purine-scaffold, inhibitor Lievi multipli effetti collaterali
VEGFR	Angiogenesi tumorale	Bevacizumab, VEGF-trap, AEE788, Cediranib, Vandetanib Inibiz. angiogenesi, danno renale

**Quali sono le modificazioni
patologiche indotte sul
tumore dalla chemio-
radioterapia neoadiuvante?**

ypTNM e downstaging tumorale

CRM (circumferential margin)

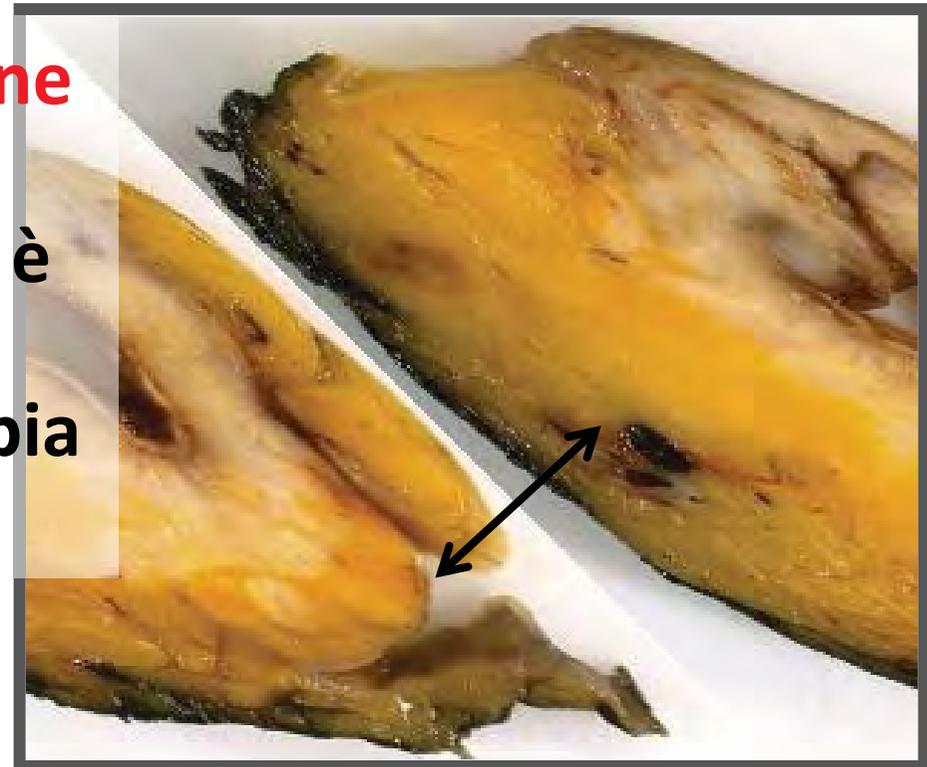
TRG (tumor regression grading)

Prefisso y

Nei casi in cui la classificazione venga eseguita durante o dopo una terapia multimodale, la categoria cTNM o pTNM deve essere identificata con il prefisso y.



ypTNM esprime l'estensione del tumore al momento dell'esame istologico (non è una stima dell'estensione tumorale prima della terapia multimodale).



Downstaging clinico-patologico

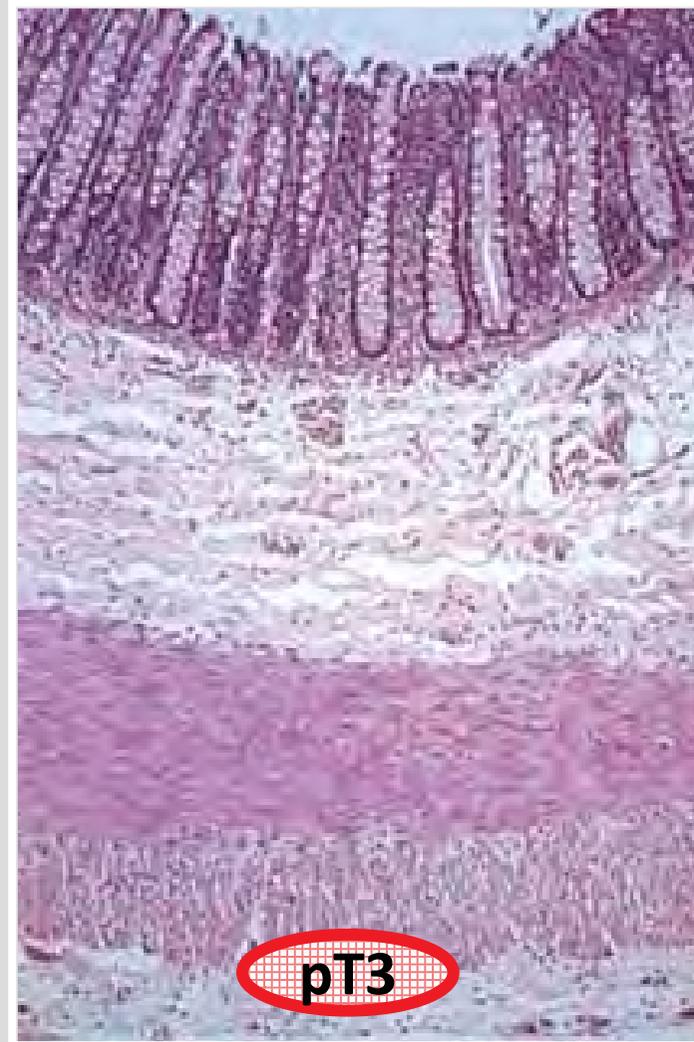
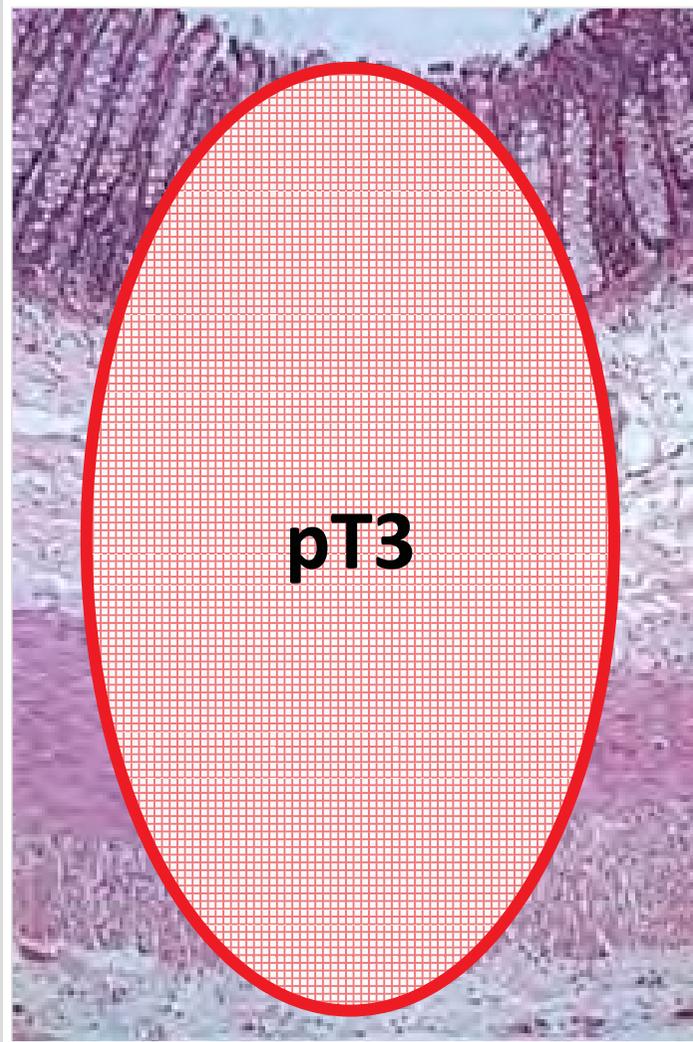
È la differenza fra lo stadio T ed N determinato prima del trattamento con risonanza magnetica o con ultrasonografia intrarettale e lo stadio patologico (pT e pN) dopo il trattamento, su pezzo operatorio.

Problema: in uno studio recente condotto su 1184 pazienti l'accuratezza dell'ultrasonografia in merito allo stadio era solo del 69%, quella della risonanza magnetica del 73%.

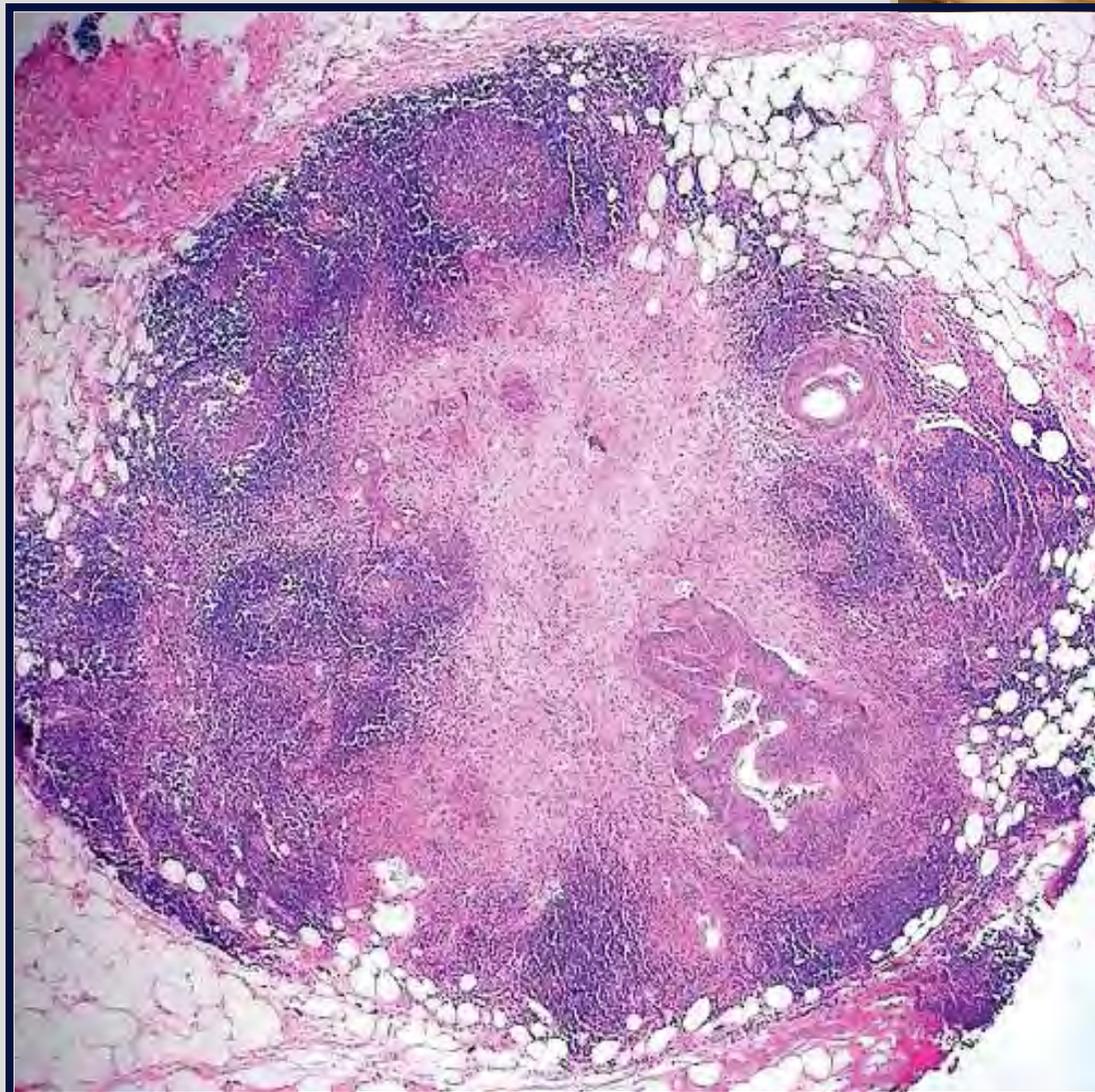
La maggiore difficoltà riguarda la differenziazione tra le lesioni T2 e quelle T3.

ypT

**È fondamentale nella valutazione del downstaging
Sembra tuttavia avere scarso valore prognostico**

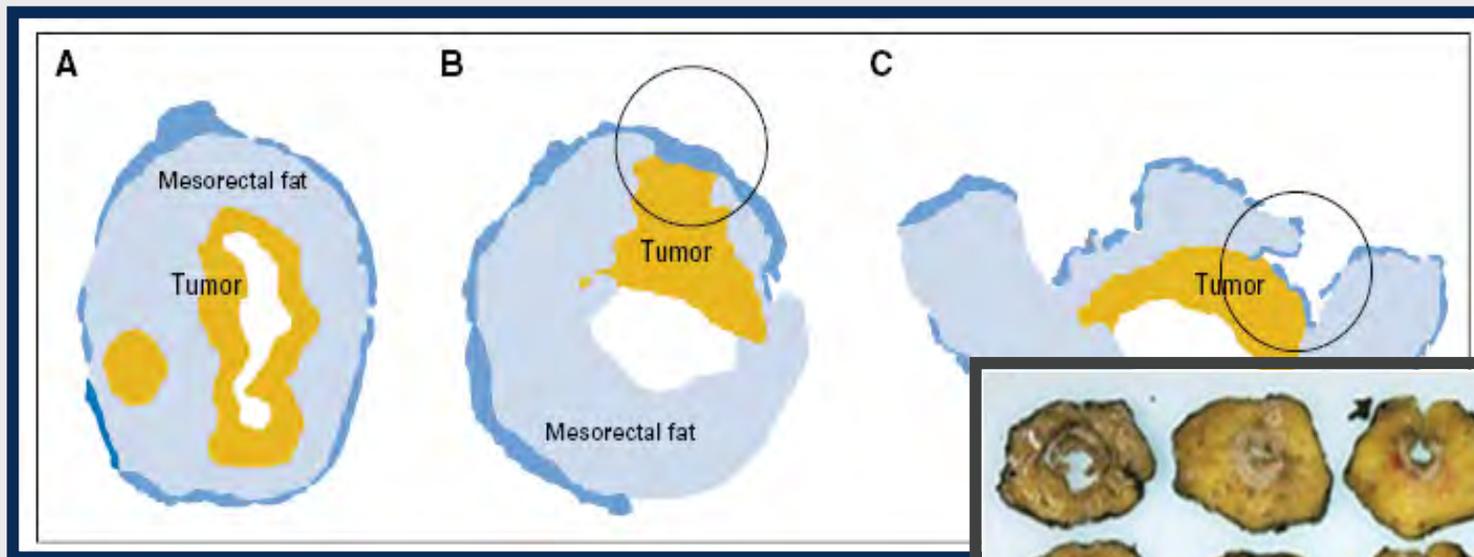


ypN sembra invece avere una discreta potenza prognostica

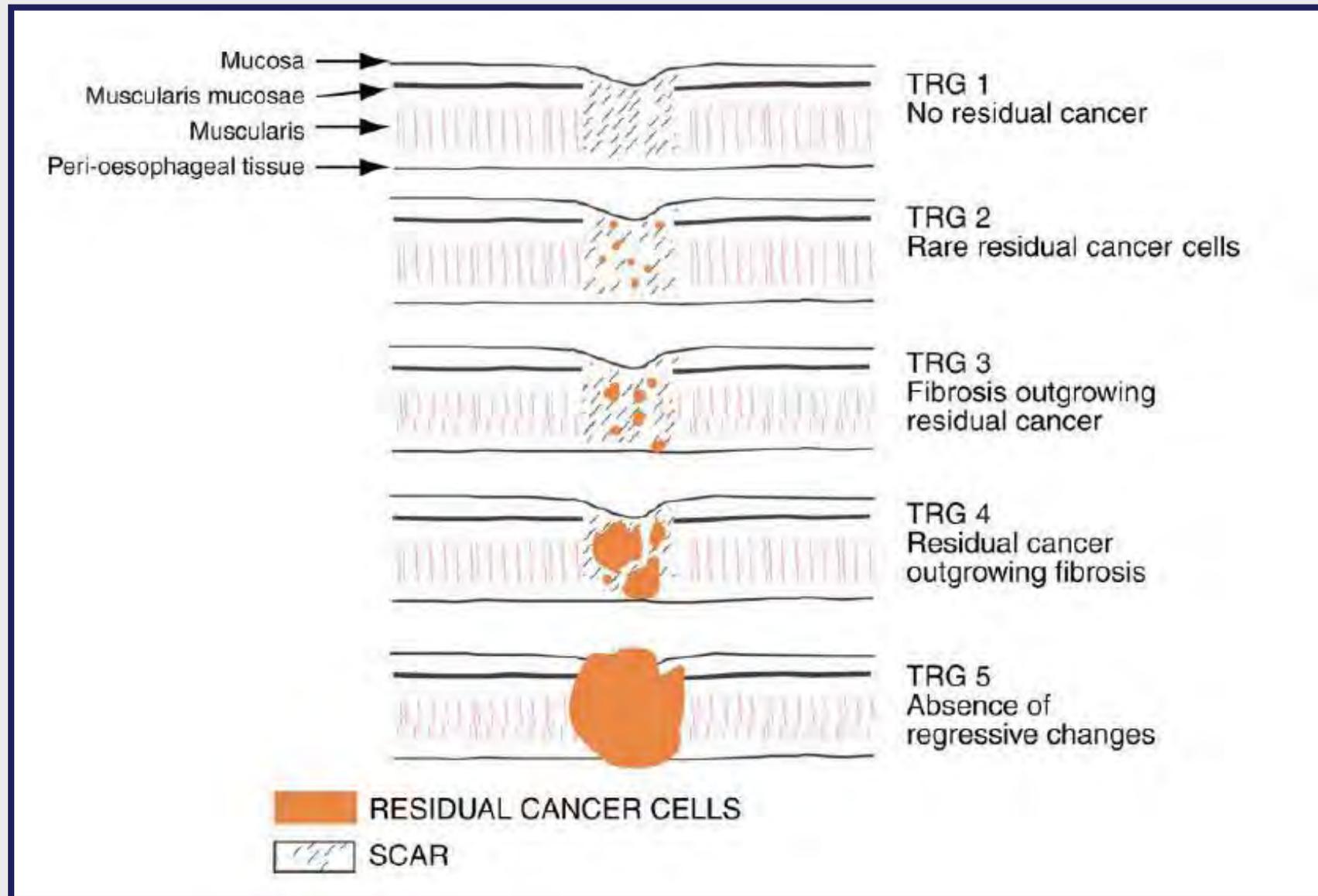


pN+

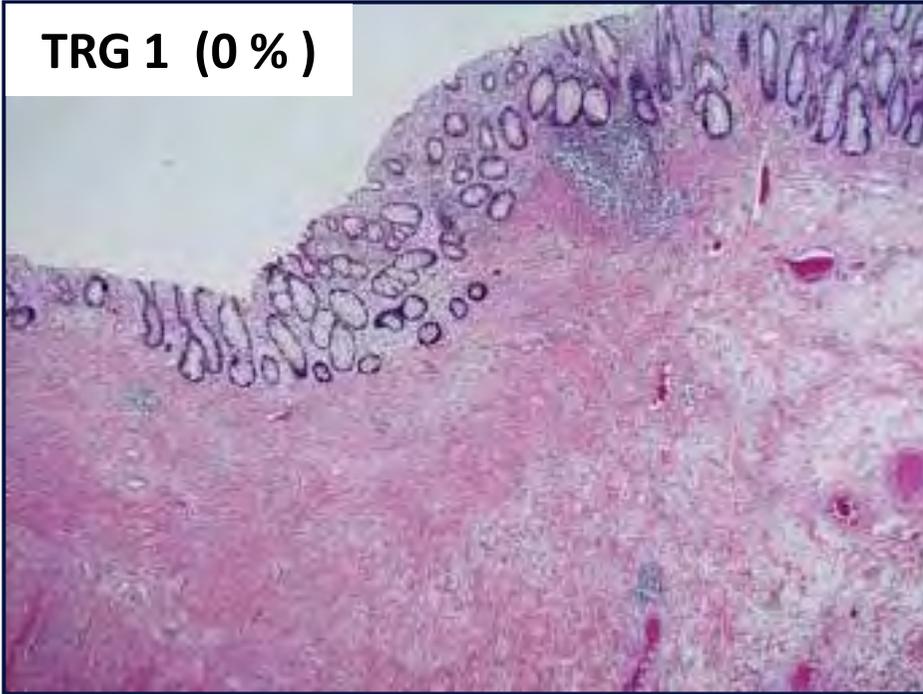
Valutazione del margine circonferenziale di resezione (CRM)



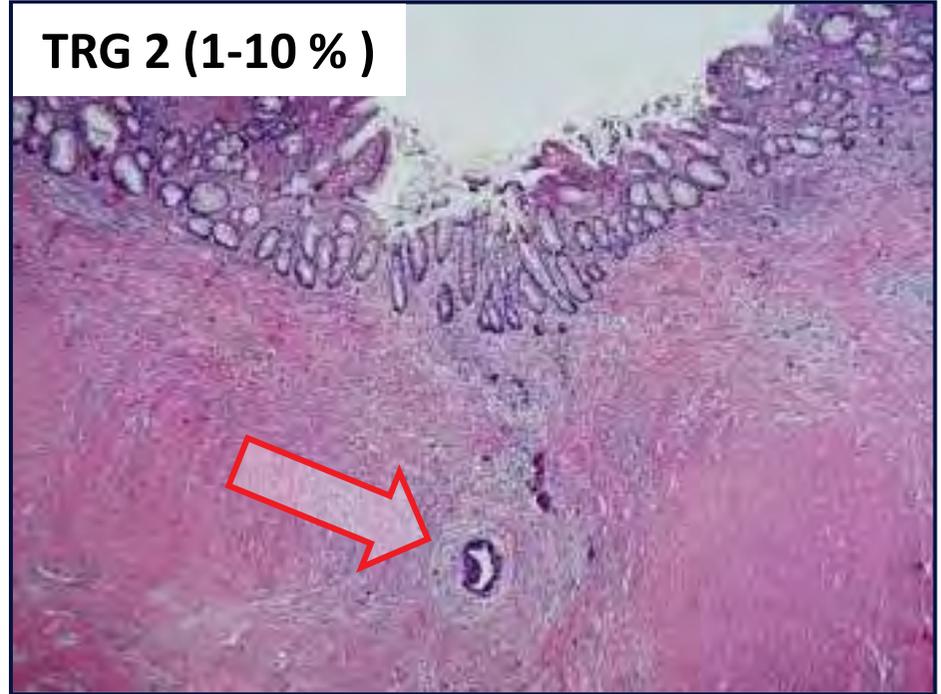
TRG (tumour regression grading)



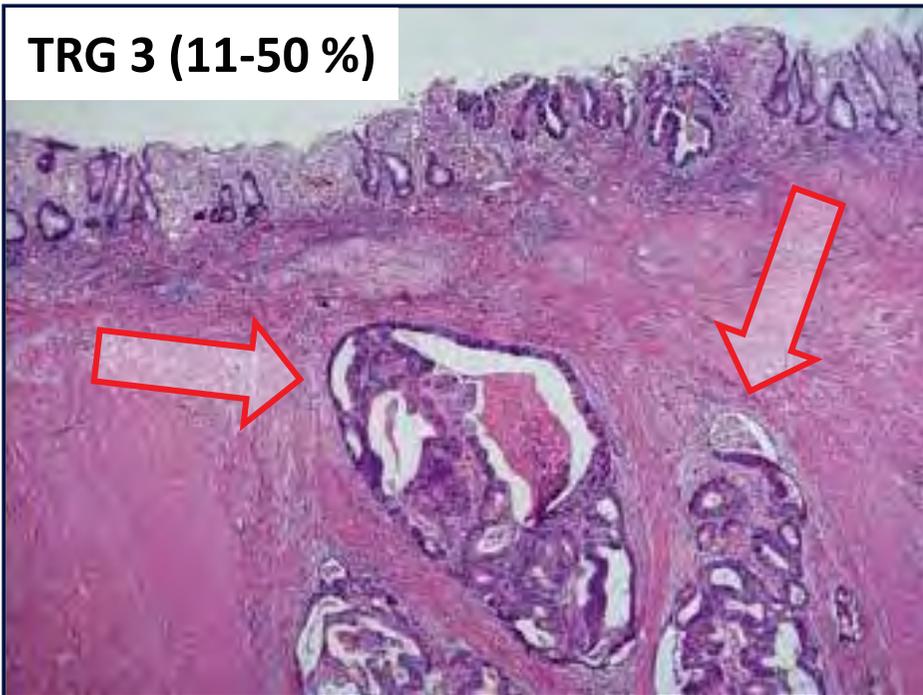
TRG 1 (0 %)



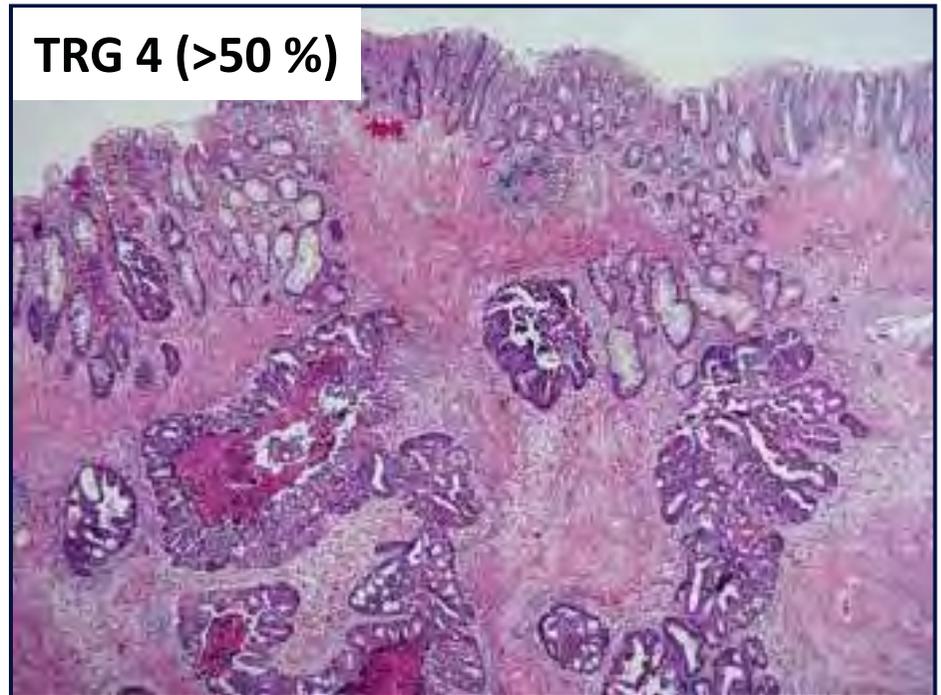
TRG 2 (1-10 %)



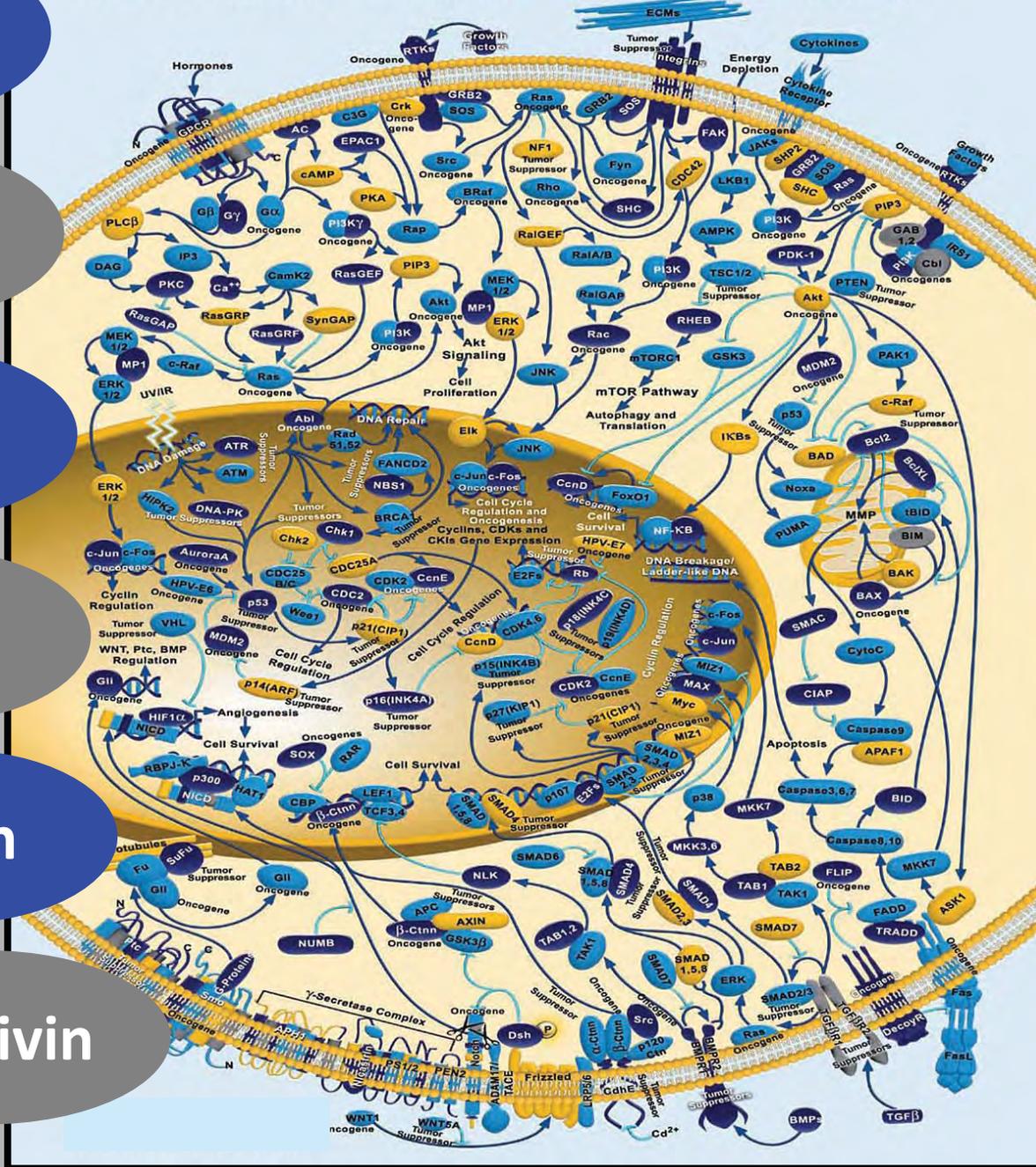
TRG 3 (11-50 %)



TRG 4 (>50 %)



Molecular Mechanisms of Cancer pathway



EGFR

VEGF

Bax

Bcl-2

Ezrin

Survivin

ypTNM

CRM

TRG

rectum bar



... grazie per l'attenzione